

東邦大学審査学位論文（博士）

博士学位論文

pH 依存性オリゴペプチド輸送担体の
基質輸送サイクルに重要な因子の同定

2020 年度

東邦大学大学院 薬学研究科

大森 明子

略語表

略語	正式名称
ABC	ATP-binding cassette
ACE	angiotensin converting enzyme
APS	ammonium persulfate
ATP	adenosine 5'-triphosphate
BSA	bovine serum albumin
CBB	coomassie brilliant blue
CCCP	carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone
CHO	chinese hamster ovary
DDM	<i>n</i> -dodecyl- β -D-maltopyranoside
DDS	drug delivery system
DEPC	diethyl pyrocarbonate
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
F-12 HAM	nutrient mixture F-12 HAM
FBS	fetal bovine serum
Gly-Sar	glycylsarcosine
G2P	glycerol-2-phosphate disodium salt n-hydrate
HEPES	<i>N</i> -2-hydroxyethylpiperazine- <i>N'</i> -2-ethanesulfonic acid
HRP	horseradish peroxidase
HOMOPIPES	homopiperazine- <i>N, N'</i> -bis-2-(ethanesulfonic acid)
hPEPT1	human oligopeptide transporter 1

略語	正式名称
ITC	isothermal titration calorimetry
MES	2-(<i>N</i> -morpholino)ethanesulfonic acid
MOE	molecular operating environment
NHE3	Na ⁺ /H ⁺ exchanger 3
PBS	phosphate buffered saline
POT	proton-dependent oligopeptide transporter
SDS	sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
SLC	solute carrier
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylene diamine
Tris	tris-(hydroxymethyl)aminomethane
Val-OMe	L-valine methyl ester
WPC	whole-cell patch clamp

目次

第1章 序論	
1.1 はじめに	6
1.2 研究目的	9
第2章 実験材料および方法	
2.1 CHO/hPEPT1 を用いた pH 依存性輸送活性調節機構の解明	
2.1.1 使用薬物・試薬	14
2.1.2 実験材料	14
2.1.3 Buffer 組成	15
2.1.4 細胞の培養	15
2.1.5 培養細胞における基質の efflux の測定	15
2.1.6 蛋白定量	16
2.1.7 数値解析	
A) pKa の算出	16
B) 有意差検定	16
2.2 YdgR タンパク質の基質認識機構の熱力学的解明	
2.2.1 使用薬物・試薬	17
2.2.2 実験材料	18
2.2.3 Buffer 組成	18
2.2.4 YdgR タンパク質の精製	20
2.2.5 SDS-PAGE 及び Western blotting	21
2.2.6 等温滴定型熱量計 (ITC) による結合熱量変化の測定	22
2.2.7 計算化学的手法による YdgR における基質分子と水分子の配置予測	22

第3章 結果および考察	
3.1 CHO/hPEPT1 を用いた pH 依存性輸送活性調節機構の解明	
3.1.1 緒言	25
3.1.2 hPEPT1 による efflux 輸送	26
3.1.3 hPEPT1 による efflux 輸送の細胞外 pH 依存性と pH 6 付近に pKa を持つアミノ酸残基の関与	28
3.1.4 ヒスチジン残基の化学修飾が efflux に与える影響	33
3.1.5 小括	35
3.2 YdgR タンパク質の基質認識機構の熱力学的解明	
3.2.1 緒言	37
3.2.2 等温滴定型熱量計 (ITC) を用いた基質ジペプチド Val-Ala と YdgR との結合に伴う熱量変化の測定	38
3.2.3 基質結合に伴う YdgR の熱力学的変化	41
3.2.4 YdgR の基質認識ポケットに存在する水和水の 基質認識機構への関与	43
3.2.5 小括	51
第4章 総括	
4.1 結論	53
4.2 展望	53
参考文献	55
謝辞	63

第 1 章 序論

1.1 はじめに

我々は、様々な栄養物質を体内に吸収することにより生命を維持している。糖類、アミノ酸やペプチド、ビタミンなど生体にとって重要な栄養物質の多くは水溶性であるため、それ自身では生体膜を透過することができない。生体はこのような水溶性低分子物質を輸送担体（トランスポーター）と呼ばれる膜内在性タンパク質を利用して細胞内に取込んでいる。

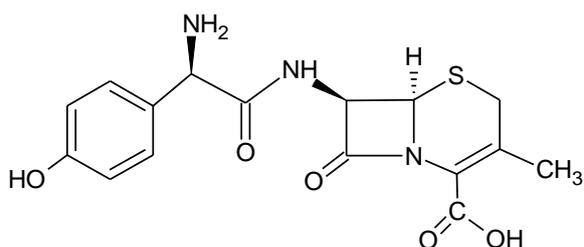
輸送担体は基質を輸送する際に利用する駆動力の違いによって大きく 2 種類に分類される。1 つは、ATP の加水分解により生じるエネルギーを直接利用する一次性能動輸送担体であり、ATP-binding cassette (ABC) 輸送担体と呼ばれる。もう 1 つは、ATP の加水分解により生じるエネルギーを利用しない輸送担体であり、solute carrier (SLC) 輸送担体と呼ばれる。SLC 輸送担体の輸送形式は 2 つ存在し、膜内外の基質の化学ポテンシャル勾配を利用する促進拡散と、一次性能動輸送担体により形成された Na^+ 、 K^+ 、 H^+ 、 Cl^- などの電気化学ポテンシャル勾配を利用して共輸送・対向輸送を行う二次性能動輸送がある。現在、ヒト ABC 輸送担体は 7 ファミリー (ABCA~ABCG) から成り立つ 51 分子、ヒト SLC 輸送担体は 66 ファミリー (SLC1~SLC66) から成り立つ 433 分子がそれぞれ HUGO Gene Nomenclature Committee (<http://www.genenames.org/>) において報告されている。なお、SLC ファミリーに関して、SLC21 (SLCOへ変更) など、現在では名称が変更されているものもある。

輸送担体は、小腸、肝臓、腎臓、血液脳関門、血液脳脊髄関門など広範な組織に発現している。小腸には、栄養物質の吸収に関与する輸送担体が多数存在する。小腸管腔内の表面は粘液質のムコ多糖からなる非攪拌水層で覆われており^{1,2}、そこには弱酸性の微小環境が存在する²。この特殊な酸性領域の形成には Na^+/H^+ 交換輸送担体 NHE3 (SLC9A3) が寄与していることが明らかとなっている^{3,4}。小腸管腔側にはプロトンの電気化学ポテンシャル勾配を利用して様々な栄養物質の取り込みを担う輸送担体が存在し、これらの輸送担体は大きなプロトン駆動性ファミリーを構築している^{5,6,7-11}。

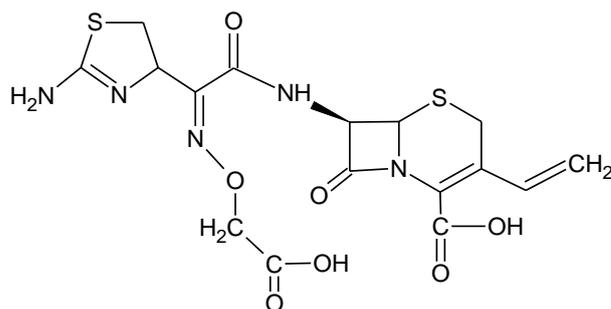
栄養物質のプロトン依存性輸送機構は、バクテリアから動物細胞に至るまで広く存在し、進化の過程で保存されている重要な輸送機構の1つである¹²。その中でも、オリゴペプチド輸送担体 (POTs) はタンパク質の消化によって生じるジペプチド、トリペプチドをプロトンの内向き電気化学ポテンシャルを駆動力として細胞内へ濃縮的に輸送し、生体内の窒素源維持に寄与することが知られている¹²。POTs はほとんど全てのジペプチド・トリペプチドを基質として認識し、輸送する¹²。アミノ酸を20種とすればジペプチドで400種、トリペプチドでは8,000種も存在するものを基質とすることから¹²⁻¹⁴、その基質特異性は低いことがわかる。小腸や腎臓、胆管の上皮細胞刷子縁膜に局在するヒトオリゴペプチド輸送担体 hPEPT1 (SLC15A1)^{15,16} は、本来の基質に加え、多数の薬物を輸送することが明らかになっており、ペプチド類似構造を持つβ-ラクタム系抗生物質¹⁷⁻²¹、ACE阻害剤などの一部^{22,23} や、抗癌剤ベスタチン²⁴ のような薬物をも基質とすることが報告されている (図 1.1.1)。

栄養物質や内因性物質を選択的に取込む能動輸送系を利用し、薬物の吸収率を向上させようとするドラッグデリバリーシステム (DDS) が、その有効性、安全性の面から注目されている。このシステムの原理は、薬物を栄養物質に結合させることで、その栄養物質とともに能動輸送系によって吸収させるというものである。その事例として、抗ヘルペスウイルス薬であるバラシクロビルや抗サイトメガロウイルス薬であるバルガンシクロビルの開発が挙げられる。これらは、それぞれアシクロビル、ガンシクロビルにアミノ酸 L-valine をエステル結合させることによってできたプロドラッグである (図 1.1.1)。両者ともペプチド結合を持たないアミノ酸様化合物であるが、hPEPT1 に認識されて運ばれることにより消化管吸収率が改善された^{25,26}。このように hPEPT1 は栄養物質と薬物の結合体を基質として認識できる寛容さを有することから DDS への応用が期待されている。これまで hPEPT1 の分子生物学的にあるいは速度論的に様々な解析が行われてきた。しかしながら hPEPT1 に輸送される基質は、電荷・官能基・疎水性・分子の大きさなどといった特性が多岐に渡り、その基質認識機構についての結論はまだ出ていない²⁷⁻³¹。また、hPEPT1 の基質輸送機構については、

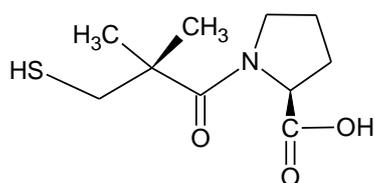
輸送される基質とプロトンの化学量論比や、基質の持つ電荷が輸送に与える影響など hPEPT1 による基質輸送においてプロトンが果たす役割について精力的に解析が行われているが^{11, 32-36}、これらと構造変化との関係については不明な点が多い。したがって hPEPT1 を標的としたプロドラッグを用いる DDS の開発にはさらなる研究が必要である。



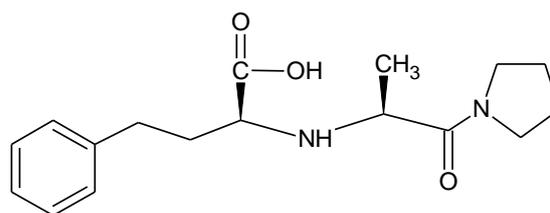
セファドロキシル



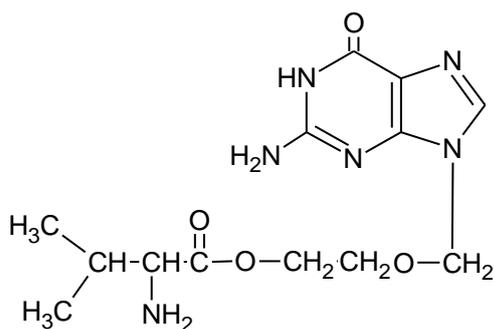
セフィキシム



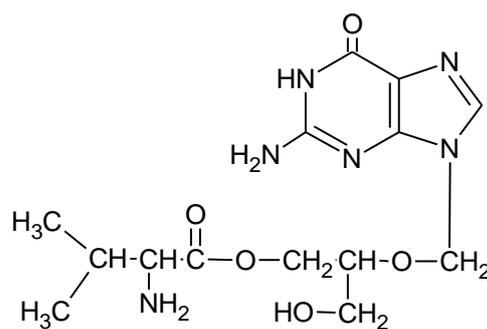
カプトプリル



エナラプリル



バラシクロビル



バルガンシクロビル

図 1.1.1 hPEPT1 の基質となる医薬品の構造式

1.2 研究目的

1.1 で述べたように hPEPT1 は栄養吸収だけでなく薬物吸収においても重要なトランスポーターであるが、その基質認識・輸送機構について解明されていない部分も多い。POTs は、構造的に二次性能動輸送担体の中でも最大級のファミリーである major facilitator superfamily (MFS) に属する³⁷。MFS 輸送担体は N 末側の膜貫通ヘリックス 6 本で構成される N 末ヘリックスバンドルと C 末側の膜貫通ヘリックス 6 本で構成される C 末ヘリックスバンドルが細胞膜内に V 字形に配置された 12 回膜貫通ドメインを持つ³⁸。POTs は MFS 輸送担体と同様の 12 回膜貫通ドメインを基本構造とし³⁸、バクテリア由来の POTs は N 末ヘリックスバンドルと C 末ヘリックスバンドルの間にさらにもう 2 本の膜貫通ヘリックスを有する³⁹。基質結合部位は N 末ヘリックスバンドルと C 末ヘリックスバンドルの間に存在し、基質は細胞膜の片側からしか基質結合部位へアクセスできないようになっている。これは alternating-access mechanism といって、MFS 輸送担体はその基質認識部位を細胞膜の外側に向けた状態 (outward open) と内側に向けた状態 (inward open) を交互に行き来させることにより基質輸送を行っている^{38,40}。

POTs の輸送機構も他の MFS 輸送担体と同じく alternating-access mechanism が考えられており⁴¹、その輸送サイクルは (1) 基質認識→ (2) 基質の分子内移動→ (3) 基質の放出→ (4) 基質輸送を伴わない輸送体の再配向の 4 つの過程からなる (図 1.2.1)。当研究室のこれまでの研究より、hPEPT1 の輸送サイクルがさらに詳細に明らかになってきた。細胞外 pH の変化に伴う hPEPT1 を介した Gly-Sar uptake は pH 5.5 を最大値とするベル型の pH profile を示し、酸性領域ではプロトン駆動力の増大に反して uptake rate が減少した⁴²。このことより、輸送活性を制御する別の調節因子の存在が示唆された。駆動力の影響を排除するため、nigericin/monensin を同時添加してプロトン濃度勾配を消去した条件下にて同様の検討をおこなったところ、ベル型とは全く異なる pH profile が示された⁴²。この時の uptake rate と細胞外 pH の関係は Henderson-Hasselbalch の式でよくフィッティングされ、pKa は 6.7 と算出

された⁴²。このことから hPEPT1 を介した基質 uptake は駆動力に加えて、pH 6.7 付近に pKa を持つあるアミノ酸残基のプロトン化状態によって制御されることが考えられた。算出された pKa の値からこのアミノ酸残基はヒスチジンであることが推察され、hPEPT1 にはある 1 つのヒスチジン残基側鎖の解離状態の変化によって決まる 2 つの状態が存在することが考えられた。この 2 つの状態とは、輸送サイクルが進行して基質輸送が起こる状態 (active form) と輸送サイクルから逸脱して基質輸送の停止した状態 (inactive form) であり、hPEPT1 による細胞外 pH 依存的な基質輸送がある 1 つのヒスチジン残基側鎖の解離状態の変化によるものであることが推察された (図 1.2.2)⁴²。Diethyl pyrocarbonate (DEPC) を用いた hPEPT1 の有するヒスチジン残基の化学修飾により輸送制御に関与するヒスチジン残基は基質認識部位の近傍に位置することが示唆され⁴²、このヒスチジン残基のプロトン化による輸送サイクルからの逸脱、即ち不活性化により pH 依存性を引き起こしている機構が考えられるが推測の域を脱しない。また、このヒスチジン残基は基質認識部位の近傍に位置しているのにも関わらず、基質認識には関与していないことも示唆されている⁴²。hPEPT1 の基質認識性については多彩な基質の認識機構を有していることは明らかになっているがこの物理化学的な因子に関しては不明な点が数多く残されている。物理化学的測定には大量の試料が必要なことと、分子レベルでの基質認識機構解明には結晶構造が必須であるため、hPEPT1 を用いた物理化学的因子の解明が極めて難しい領域となっている。

そこで、本研究において、この基質輸送サイクルに重要な因子、pH 依存的輸送活性調節因子と基質認識における重要な物理化学的因子について検討をおこなった。第一に、動物細胞 hPEPT1 発現系を用いた基質 efflux 輸送測定から、その輸送活性調節機構について明らかにした。続いて、hPEPT1 が属する pH 依存性オリゴペプチド輸送担体ファミリーにおいて、hPEPT1 と類似点が高く⁴³、結晶構造が明らかとなっている⁴⁴大腸菌由来のオリゴペプチド輸送担体である YdgR (DtpA) をモデル輸送担体として用い、等温滴定型熱量測定 (ITC) とコンピューターシミュレーションにより基質認識に関わる物理化学的因子を明らかにした。

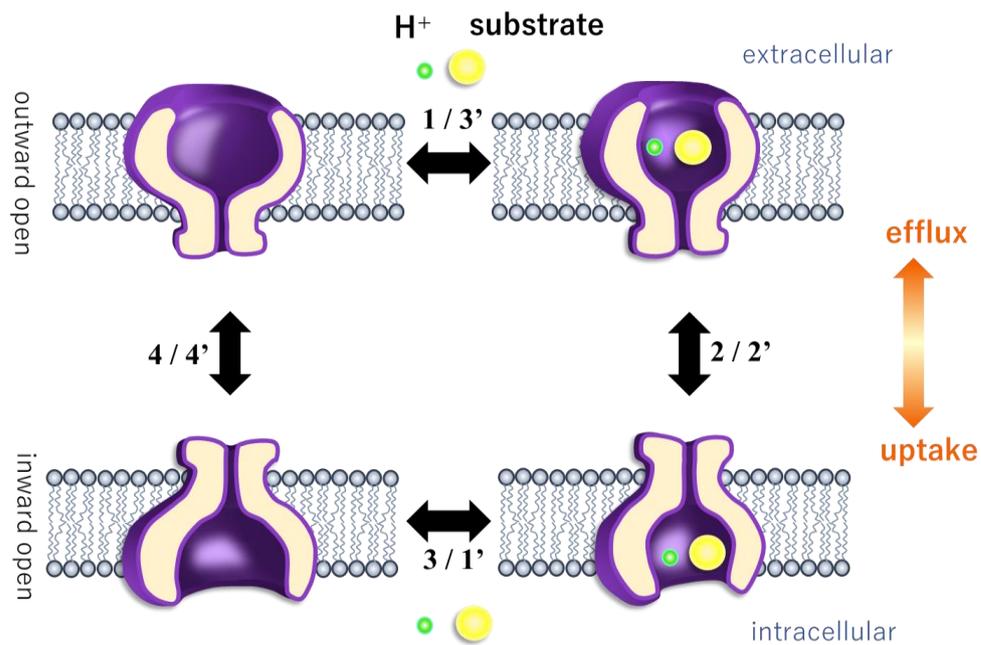


図 1.2.1 POTs の基質輸送サイクル

オリゴペプチド輸送担体は細胞内への輸送である uptake (1→4) と細胞外への輸送である efflux (1'→4') の双方向の輸送が可能であり、その輸送サイクルは (1) 基質認識→ (2) 基質の分子内移動→ (3) 基質の放出→ (4) 基質輸送を伴わない輸送体の再配向の 4 つの過程からなる。

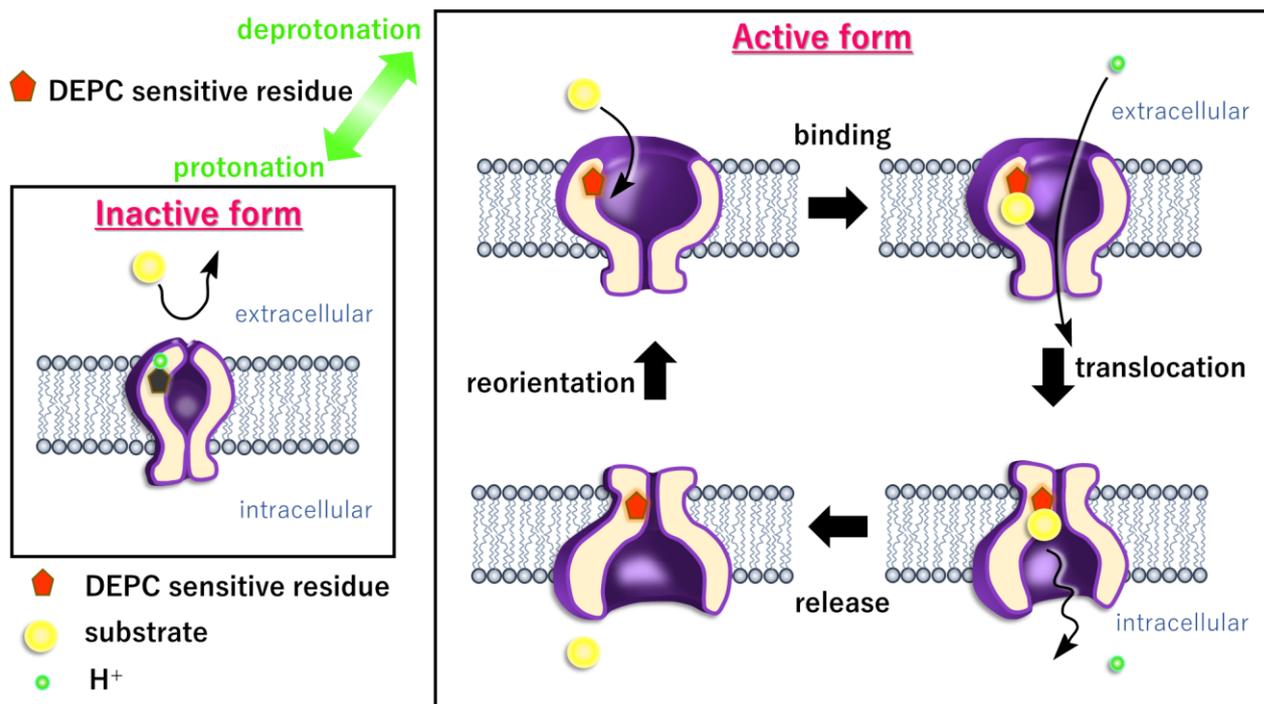


図 1.2.2 hPEPT1 が細胞外 pH 依存性を示すメカニズム

hPEPT1 の細胞外側の基質認識部位近傍にあるヒスチジン残基 (DEPC sensitive residue) が pH sensor としてはたらき、その解離状態が細胞外 pH に依存して変化することで、基質輸送可能な active form と輸送停止状態の inactive form をとる。

第 2 章 実験材料および方法

2.1 CHO/hPEPT1 を用いた pH 依存性輸送活性調節機構の解明⁴⁵

2.1.1 使用薬物・試薬

F-12 HAM	Sigma-Aldrich
Cephalexin	Sigma-Aldrich
Cephradine	Sigma-Aldrich
Val-OMe	Sigma-Aldrich
Gly-Sar	Sigma-Aldrich
DEPC	Sigma-Aldrich
Fetal bovine serum	Gibco BRL Life Technology
Trypsin	Gibco BRL Life Technology
Penicillin-Streptomycin Solution (×100)	富士フイルム和光純薬株式会社
blastcidin S	Kaken Pharmaceutical Co. Ltd
Nigericin	富士フイルム和光純薬株式会社
Monensin	富士フイルム和光純薬株式会社
CCCP	富士フイルム和光純薬株式会社
HEPES	同仁化学研究所
MES	同仁化学研究所
HOMOPIPES	Research Organics, Inc.
[³ H]-Gly-Sar	Moravek Biochemical, Inc.
ACSII scintillation counting cocktail	Amersham/Pharmacia

その他は全て富士フイルム和光純薬株式会社から購入した特級試薬を用いた。また、ペプチド化合物について、特に表記のないものはL体である。

2.1.2 実験材料

CHO/hPEPT1 当教室で樹立したもの⁴²。

2.1.3 Buffer 組成

Uptake buffer

NaCl	140 mM
KCl	3 mM
CaCl ₂	1 mM
MgCl ₂	1 mM
D-Glucose	10 mM
HEPES/NaOH	5 mM

pH 6.5 から pH 8.0 で使用。pH 5.0 から pH 6.5 では HEPES/NaOH の代わりに MES/NaOH、pH 3.5 から pH 5.0 では HEPES/NaOH の代わりに HOMOPIPES/NaOH を用いた。

2.1.4 細胞の培養

hPEPT1 安定大量発現 CHO 細胞 (CHO/hPEPT1) は、37°C、5% CO₂ 存在下、75 cm² 培養フラスコ内で培養した。培地には 10% FBS、抗生物質 (100 units/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin, 10 µg/mL blastcidin S) を含む F-12 HAM を用いた。2 日毎に培地交換を行い、80% コンフルエントに達した状態で 0.02% EDTA、0.05% trypsin 処理により継代した。6 well plate に 2 × 10⁵ cells/well の密度で播種後、3 日経過したものを efflux 測定に使用した。

2.1.5 培養細胞における基質の efflux の測定

培地を除去後、洗浄用緩衝液 (uptake buffer, pH 7.4) で洗浄し、同緩衝液 (2 mL/well) で 37°C、5 min プレインキュベートした。緩衝液を除去後、1 µCi/mL [³H]-Gly-Sar、10 µM Gly-Sar を含む uptake 用緩衝液 (uptake buffer, pH 6.0) を各 well に 0.5 mL ずつ加え 37°C で 5 min インキュベートし、細胞内に Gly-Sar を取り込ませた。その後、緩衝液を除去して、氷冷した洗浄用緩衝液で 2 回洗浄した。続いて、efflux 用緩衝液 (uptake buffer) を各 well に 1 mL 加えて 37°C でインキュベートし、efflux を開始させた。Trans-stimulation 実験には、5 mM の各試薬を含む efflux 用緩衝液を加えて、efflux を開始させた。各 well から一定時間ごとに

50 μ L ずつ緩衝液をバイアルに採り、各時間のサンプルとした。最後のサンプリングが終わったところで、残った緩衝液は除去し、氷冷した洗浄用緩衝液で洗浄した。細胞は細胞溶解液 1 M NaOH を 1 mL 加えて可溶化し、1 M HCl を 1 mL 加えて中和させたものを、細胞内残存量を測定するサンプルとした。各サンプルをバイアルに移し、ACS II scintillation counting cocktail を適量加え、液体シンチレーションカウンター（LSC 2500、Packard）で ^3H -radioactivity を測定した。各時間の細胞内残存量は時間 0 における緩衝液中および細胞内に残存する ^3H -Gly-Sar の量の合計を総量とし、規格化して算出した。

2.1.6 蛋白定量

蛋白定量は Bio-Rad protein assay kit (Bio-Rad Laboratories) を用いて行った。操作は付属のプロトコルに従い、分光光度計で波長 595 nm における吸光度を測定した。

2.1.7 数値解析

A) pKa の算出

10 μ M nigericin/monensin あるいは 40 μ M CCCP 非存在下・存在下における hPEPT1 による Gly-Sar efflux rate の細胞外 pH 依存性の測定データを、以下に示す Henderson-Hasselbälch 型の式にフィッティングすることであるアミノ酸残基側鎖の pKa を算出した。

$$k = \frac{k_{max,eff}}{1 + 10^{pK_a - pH}} \quad \text{式 1}$$

k : the initial rate of Gly-Sar transport

$k_{max,eff}$: the maximum transport rate value

pH : the medium pH

pKa : the association of the proton

B) 有意差検定

全て実験は少なくとも 3 回実施し、測定結果は平均値 \pm 標準偏差 (mean \pm S.E.) で示した。また、有意差検定は Dunnett's multiple comparison test により行った。有意差の判定は、 $p < 0.05$ の場合にありとした。

2.2 YdgR タンパク質の基質認識機構の熱力学的解明

2.2.1 使用薬物・試薬

Bacto™ Agar	Becton, Dickinson and Company
Bacto™ Tryptone	Becton, Dickinson and Company
Bacto™ Yeast Extract	Becton, Dickinson and Company
Overnight Express™ LB medium	Sigma-Aldrich
Cefadroxil	Sigma-Aldrich
HEPES	同仁化学研究所
EDTA	同仁化学研究所
Ampicillin	富士フイルム和光純薬株式会社
DTT	富士フイルム和光純薬株式会社
Tris	富士フイルム和光純薬株式会社
NaN ₃	富士フイルム和光純薬株式会社
G2P	富士フイルム和光純薬株式会社
Histidine	富士フイルム和光純薬株式会社
Valacyclovir	富士フイルム和光純薬株式会社
DDM	Anatrace
Val-Ala	国産化学株式会社
Val-Ser	国産化学株式会社
Val-Phe	国産化学株式会社
Val-Tyr	国産化学株式会社
Val-Val	国産化学株式会社
Ala-Val	国産化学株式会社
Ser-Val	国産化学株式会社
Phe-Val	国産化学株式会社

Tyr-Val 国産化学株式会社

Ala-Leu 国産化学株式会社

Gly-Sar 国産化学株式会社

その他は全て富士フイルム和光純薬株式会社から購入した特級試薬を用いた。また、ペプチド化合物について、特に表記のないものはL体である。

2.2.2 実験材料

BL21(DE3) Invitrogen

pET/YdgRHis プラスミド 当研究室で樹立したもの。

マウス抗 6×His-tag 抗体 (HRP 標識) Sigma-Aldrich

ヤギ抗ラビット IgG 抗体 (HRP 標識) Sigma-Aldrich

プレシジョン Plus プロテイン™ 未着色スタンダード Bio-Rad

MagicMark™ XP Western Protein Standard Thermo Fisher Scientific

2.2.3 Buffer 組成

Lysis buffer

HEPES/Tris 10 mM

EDTA 0.5 mM

DTT 1 mM

pH 7.4 に調製して使用した。

Solubilized buffer

Tris 20 mM

NaCl 300 mM

Glycerol 10%

NaN₃ 0.01%

HCl で pH 8.0 に調製して使用した。

His trap wash buffer

Tris	20 mM
NaCl	300 mM
Glycerol	10 %
NaN ₃	0.01%
Histidine	2 mM
DDM	0.04%

HCl で pH 8.0 に調製して使用した。

His trap elute buffer

Tris	20 mM
NaCl	300 mM
Glycerol	10%
NaN ₃	0.01 %
Histidine	200 mM
DDM	0.04%

HCl で pH 8.0 に調製して使用した。

G2P buffer

Glycerol-2-Phosphate Disodium Salt n-Hydrate	10 mM
DDM	0.04%

HCl で pH 6.0 に調製して使用した。

2×SDS sample buffer

Tris-HCl pH 6.8	100 mM
SDS	4%
2-Mercaptoethanol	10%
Glycerol	20%
Bromophenol blue	0.004%

PBS-T (PBS-Tween 20)

Tween 20	0.05%
----------	-------

PBS（カルシウム・マグネシウム不含）に Tween 20 を上記の濃度となるように加えて使用した

CBB 染色液

CBB-R250	0.25%
Methanol	46.6%
酢酸	10%

脱染色液

Methanol	45%
酢酸	10%

2.2.4 YdgR タンパク質の精製⁴³

E. coli BL21(DE3)細胞に pET/YdgRHis プラスミドを導入し、75 µg/mL ampicillin を含む LB 培地（Bacto Tryptone 10 g、Bacto Yeast Extract 5 g、NaCl 10 g/L）5mL を用い、37 °Cで A₆₀₀ = 0.5~1 程度となるまで震盪培養した。BL21(DE3)培養液を 75 µg/mL ampicillin、1 % glycerol を含む Overnight Express 培地（Overnight Express™ LB medium 45 g/L）で 1000 倍希釈し、37°Cで一晩震盪培養した。遠心分離（2,500×g、5 min、4°C）により集菌し、lysis buffer で wash した。4 L 培養液の細胞ペレットを 160 mL の lysis buffer で再懸濁後、氷上での超音波処理により細胞破碎を行った。超音波処理には BRANSON SONIFIER（Branson Ultrasonics Corp）を用い、output control 5、duty cycle 50%で 1 分間破碎した後、氷上で 5 分間静置という一連の操作をサンプルの粘性が十分に下がるまで繰り返し行った。遠心分離（4,500×g、8 min、4°C）によって未破碎菌を除去した後、上清を高速超遠心分離（105,100×g、1 h、4°C）により膜を沈殿させた。YdgR 膜を 1.2% DDM を含む solubilized buffer 中で穏やかに攪拌することにより（60 min、4°C）、可溶化した。高速遠心分離（4°C、34,000 rpm、1 hr）により不

溶性画分を除去した後、上清を His Trap™ HP 5 mL (Cytiva) にアプライし、20 mL 以上の His trap wash buffer で平衡化を行った。50 mL の His trap wash buffer で wash した後、His trap elute buffer で溶出した。溶出タンパク質は、ÄKTAprime plus (Cytiva) によって分画し、UV モニターで 280 nm の吸光度を測定した。精製した YdgR タンパク質について、Western blotting により YdgR の発現、SDS-PAGE CBB 染色のバンド強度により精製純度をそれぞれ検証した (方法は後述 2.2.5 の通り)。カラム溶出液からの希釈タンパク質を遠心式限外ろ過フィルター (Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Units (cut off 50 kDa)、Merk Millipore) を用いて濃縮後、実験に使用するまで -20°C に保存した。

2.2.5 SDS-PAGE 及び Western blotting

タンパク質抽出液を等倍量の 2×SDS sample buffer と混合し、変性処理を行った。Stacking gel (4.5% アクリルアミド、125 mM Tris-HCl pH 6.8、0.1% SDS、0.1% APS、0.1% TEMED) 及び running gel (10% アクリルアミド、250 mM Tris-HCl pH 8.8、0.1% SDS、0.1% APS、0.1% TEMED) を用いて電気泳動し、各タンパク質を分離した。続いて、ポリアクリルアミドゲルから PVDF メンブレンへタンパク質の転写を行った。転写は、transfer buffer (48 mM Tris、39 mM glycine、20% methanol、1.3 mM SDS) に浸したろ紙にポリアクリルアミドゲル及びメンブレンをはさみ、15V の電圧をかけて行った。転写後、メンブレンを blocking buffer (1% スキムミルク/PBS-T) 中で 1 時間振盪した。Diluent buffer (0.5% スキムミルク/PBS-T) で 10,000 倍に希釈した抗 6×His-tag 抗体とメンブレンを密封し、室温で 1 時間反応させた。その後、メンブレンを PBS-T で 10 分×3 回洗浄し、diluent buffer で 100,000 倍に希釈した HRP 標識抗ラビット IgG 抗体とメンブレンを密封し、室温で 1 時間反応させた。その後、メンブレンを PBS-T で 10 分×3 回洗浄し、ECL™ Prime Western Blotting Detection Reagents (Cytiva) を用いて発光させ、Lumino Graph II (ATTO) により撮影した。

2.2.6 等温滴定型熱量計 (ITC) による結合熱量変化の測定

G2P buffer へのバッファー交換を行うため、濃縮 YdgR タンパク質を透析膜 (MWCO 50 kDa, Spectra/Por 7, REPLIGEN) の内側に入れて一晩透析した (16 時間以上、4°C)。サンプルに対しておよそ 50 倍量の buffer で透析し、透析を開始してからおよそ 2 時間後に新しい buffer への入れ替えを行った。

熱量測定は、MicroCal iTC₂₀₀ System (Malvern Panalytical) を用いて行った。すべての測定は、温度 25 °C で実施した。測定サンプルのタンパク質及びジペプチドは、測定前にフィルターろ過 (0.22 μm) と脱気を行った。それぞれの実験において、YdgR (8~21 μM) が充填されたサンプルセルにジペプチド (0.6~5 mM) を 19 回滴定した。初回は 1 μL 滴定し、その後は 150 sec 間隔で 2 μL ずつ滴定した。各滴定による熱量変化を算出し、リガンド/サンプルモル比に対してプロットした。ORIGIN 7 ソフトウェア (Origin Lab) を用いて One Set of Sites モデルで結合部位数 1 と仮定してフィッティングを行い、エンタルピー変化 (ΔH) 及び結合定数 (K_d) を算出した。タンパク定量は BCA protein assay kit (Thermo SCIENTIFIC) を用いて行った。操作は付属のプロトコルに従い、分光光度計で波長 562 nm における吸光度を測定した。

2.2.7 計算化学的手法による YdgR における基質分子と水分子の配置予測

pH 6.5 での YdgR の結晶構造 (PDB code、6GS1、resolution 3.29 Å) とジペプチドとのドッキングシミュレーションを行った。ドッキングシミュレーションには AutoDock4⁴⁶ を用いた。結晶構造から全ての heteroatom と結晶化するために用いられた nanobody を除いたあと、UCSF Chimera⁴⁷ を用いて水素原子を付加させた。YdgR with valganciclovir (pH 9.0、PDB code 6GS4、resolution 2.65 Å) の構造をもとに valganciclovir 分子の中心をグリッド中心とし、グリッドサイズ 40 x 40 x 40 points (spacing 0.375 Å) として、genetic algorithm により、配座探索を行った。Genetic algorithm の試行回数は、100、maximum No. generation は 270000 として、

Lamarckian GA4.2 でドッキングシミュレーションを行った。統計力学的手法による 3D-RISM 理論に基づいて水分子の配置を予測した。水分子の確率密度分布計算は、統合計算化学プラットフォームである MOE (Molecular Operating Environment, Chemical Computing Group, Montreal, Canada) ⁴⁸ を用いた。ジペプチドドッキング YdgR 構造を鋳型とし、”Protonate 3D” モジュールで 300 K、pH 6.0、Salt 0 の条件で水素原子を付加した。水素原子付加構造に対し、”Solvent Analysis” モジュールでリガンドから 10 Å 以内の空間に対し、計算精度を”Tight” に設定して水分子の確率密度分布を計算した。

第 3 章 結果および考察

3.1 CHO/hPEPT1 を用いた pH 依存性輸送活性調節機構の解明⁴⁵

3.1.1 緒言

hPEPT1 の基質の uptake は細胞外 pH 依存性であり、大部分の中性基質の pH profile は pH 5.5~6.0 を最大とするベル型を示す^{8,11,34,49,50}。当研究室では、uptake のベル型を示す細胞外 pH 依存性は駆動力の変化に加えて、hPEPT1 の有するある 1 つのアミノ酸残基側鎖の解離状態の変化によって説明されることを明らかにした (図 1.2.2)⁴²。ヒスチジン修飾試薬 DEPC を用いた hPEPT1 の有するヒスチジン残基の化学修飾により、輸送制御に関与するアミノ酸残基は細胞外側の基質認識部位近傍に位置するヒスチジン残基であることが予想された⁴²。

hPEPT1 は基質をプロトンとの共輸送により細胞内に取込む (uptake) だけでなく、細胞内から細胞外へ基質を放出 (efflux) することも可能な bi-directional な輸送担体である (図 1.2.1)^{19, 20, 35, 51}。以前、当研究室では Whole-cell Patch Clamp (WPC) 法を用いて hPEPT1 による基質輸送電流を測定し、hPEPT1 による中性ジペプチドの uptake と efflux は、いずれもプロトンとの共輸送であることを明らかにした⁵¹。このように hPEPT1 による基質の bi-directional な輸送は同一の輸送機構を介していることが考えられることから、この制御機構は efflux の細胞外 pH 依存性においても関与している可能性がある。Efflux は uptake と異なり、プロトン結合部位及び基質認識部位が新たに明らかとなった pH 依存性の輸送活性調節部位と反対側にあることより、これらの部位のプロトン化の影響を排除した状態での明瞭な解析が可能である。そこで、efflux の細胞外 pH 依存性について検討を行ったので、以下に述べる。

3.1.2 hPEPT1 による efflux 輸送

efflux の速度論的解析および *trans*-stimulation 効果について検討した。 [³H]-Gly-Sar を細胞内に pre-load した後、無限希釈法により、pre-load した [³H]-Gly-Sar の CHO/hPEPT1 からの efflux を測定した。 [³H]-Gly-Sar 細胞内残存量の経時変化は one-exponential でよく記述される結果となった (図 3.1.1 A)。また、efflux 測定時に細胞外へ各試薬を添加すると、hPEPT1 の基質である Gly-Sar、cephradine、cephalexin、Val-OMe では、 [³H]-Gly-Sar の efflux rate が増大する *trans*-stimulation 効果が観察された (図 3.1.1 B)。一方で、hPEPT1 の基質ではない glycine、valine では、このような *trans*-stimulation 効果は観察されなかった。したがって、この efflux が hPEPT1 を介した輸送過程を反映していることが明らかとなった。

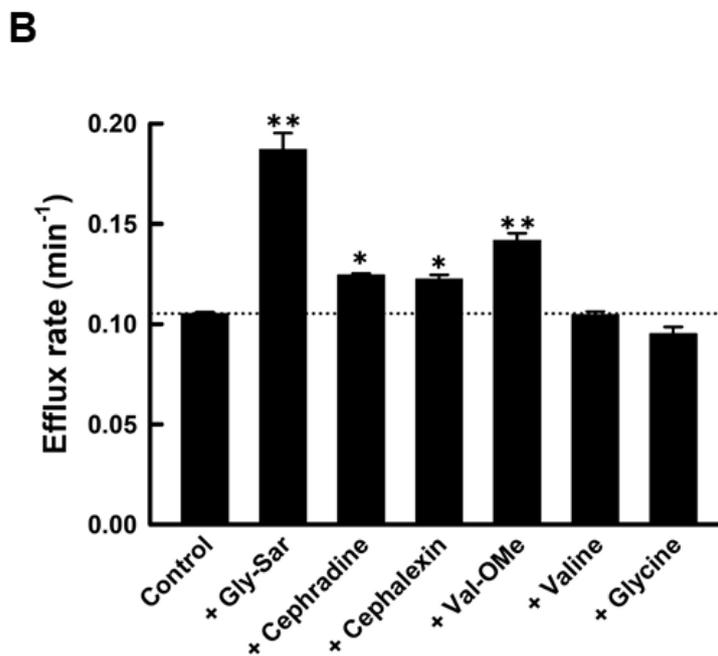
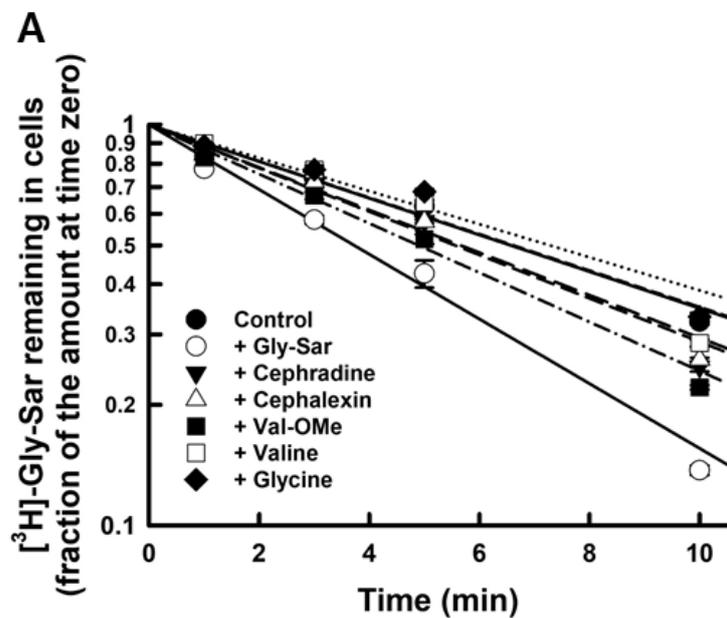


図 3.1.1 hPEPT1 による efflux の速度論的解析

CHO/hPEPT1 に pre-load した $[^3\text{H}]\text{-Gly-Sar}$ の細胞内残存量の経時変化を測定した (A)。各試薬を 5 mM 添加した際の efflux rate を算出し (B) に示した。(mean \pm S.E., $n = 3 - 6$, $**p < 0.01$ (vs. control), $*p < 0.05$ (vs. control))

3.1.3 hPEPT1 による efflux 輸送の細胞外 pH 依存性と pH 6 付近に pKa を持つアミノ酸残基の関与

CHO/hPEPT1 における Gly-Sar の efflux の細胞外 pH 依存性を検討した。細胞外 pH 3.5 から pH 8.0 での efflux の測定結果を図 3.1.2 A に示した。efflux は細胞外 pH の低下とともにその efflux も低下し、pH 4.0 以下では efflux はほぼ停止した。pH 3.5 において停止した efflux は、pH 6.0 にすることによって efflux が再開することが観察された (図 3.1.2 B)。このことから、低 pH 条件下における efflux の停止は細胞や蛋白質の不可逆的な障害によるものではないことが考えられる。図 3.1.2 A から各細胞外 pH における efflux rate を算出し、細胞外 pH に対してプロットした結果が図 3.1.3 である。efflux rate と細胞外 pH の関係は Henderson-Hasselbalch の式 (式 1、2.1.7) によくフィットし、pKa は 5.74 ± 0.04 (\pm S.D.) と算出された。基質として用いている Gly-Sar のアミノ基とカルボキシル基の pKa はそれぞれ 8.5 と 2.8 であり⁵²、efflux activity の細胞外 pH 依存性がみられた pH 4.0 から pH 7.5 の間ではそのほとんどが電荷的に zwitter イオンの状態で存在していると想定される。一方、細胞外 pH の低下は外向きプロトン濃度勾配の減少をもたらすことより、低 pH 条件下における efflux の停止がプロトン駆動力の減少による可能性が考えられる。そこで、プロトンと K⁺イオンのイオノフォアである nigericin、プロトンと Na⁺イオンのイオノフォアである monensin を同時に添加することによって、細胞内外の膜電位を保持しつつプロトン濃度勾配を消去した条件下^{53 54}、すなわち駆動力が一定となる条件下において Gly-Sar efflux activity の細胞外 pH 依存性を測定した。その結果はプロトン濃度勾配存在下とほとんど変わらず、Henderson-Hasselbalch の式 (式 1、2.1.7) によるフィッティングでは pKa が 5.41 ± 0.16 (mean \pm S.D.) と算出された (図 3.1.4)。この pH profile は CCCP を添加することによって、細胞内外の pH 勾配に加えて膜電位も消去した条件下においても不変であり、その pKa は 5.60 ± 0.13 (mean \pm S.D.) と同程度であった。これらのことから、efflux はプロトンの電気化学ポテンシャル

を駆動力とはせず、基質の化学ポテンシャルに従って発生し、細胞外 pH に依存したある 1 つのアミノ酸残基側鎖の解離状態の変化によって制御されるものであることが示唆された。算出された pKa の値より、このアミノ酸残基は uptake と同じくヒスチジンであることが推察された。

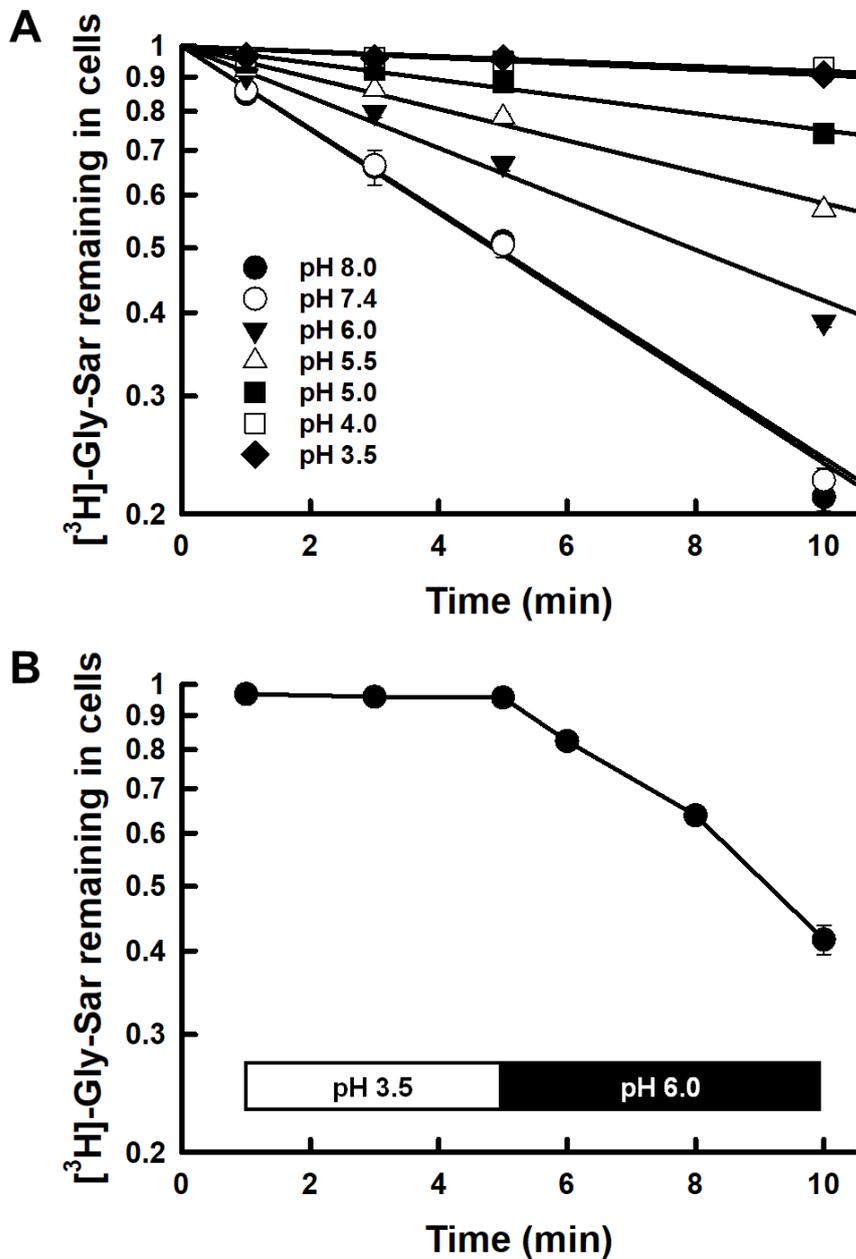


図 3.1.2 hPEPT1 による Gly-Sar efflux の細胞外 pH 依存性

CHO/hPEPT1 に pre-load した $[^3\text{H}]$ -Gly-Sar の細胞内残存量の経時変化を各 pH において測定した (A)。(mean \pm S.E., n=3~6) CHO/hPEPT1 を低 pH 条件に曝し、Gly-Sar の efflux に与える影響を検討した。pH を 6.0 にした時点から efflux が観察された (B)。(mean \pm S.E., n=3)

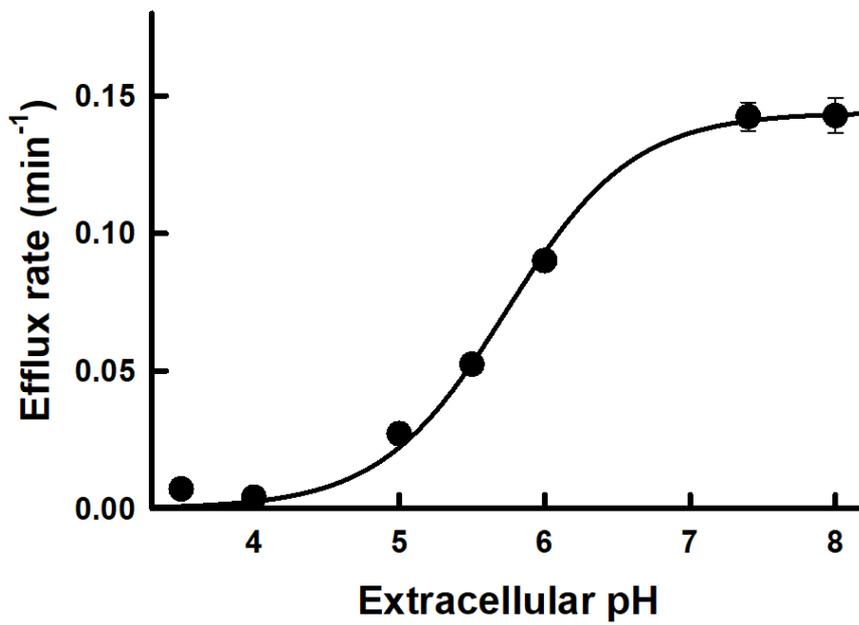


図 3.1.3 hPEPT1 による Gly-Sar efflux rate の細胞外 pH 依存性

図 3.1.2 A の各細胞外 pH における efflux rate を算出し、細胞外 pH に対してプロットした。

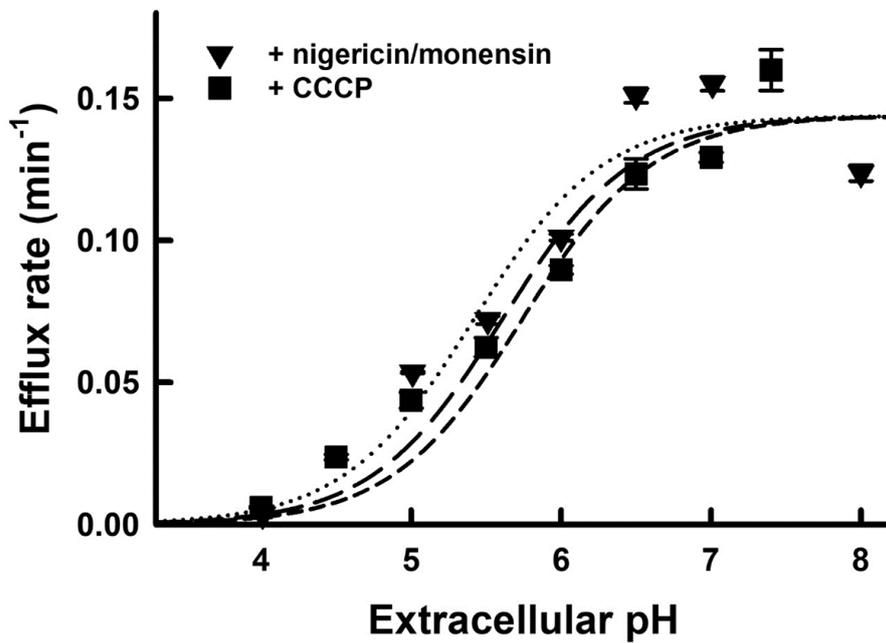


図 3.1.4 プロトン駆動力非存在下での hPEPT1 による Gly-Sar efflux rate の細胞外 pH 依存性

10 μ M nigericin、monensin 添加時及び 40 μ M CCCP 添加時の CHO/hPEPT1 における [³H]-Gly-Sar の efflux rate を測定した。短破線は図 3.1.2 の control、点線及び長破線はそれぞれ nigericin/monensin 添加時と CCCP 添加時である。(mean \pm S.E., n = 3-6)

3.1.4 ヒスチジン残基の化学修飾が efflux に与える影響

CHO/hPEPT1 における efflux activity の pH profile は、Henderson-Hasselbalch の式によくフィットし、pKa がおよそ 6 であることからヒスチジン残基のプロトン化状態を反映していると考えられた。ヒスチジン側鎖であるイミダゾール環は pH 5.5~7.4 の範囲に pKa を持つことより^{55,56}、得られた efflux activity の pH profile は特にイミダゾール環のプロトン化状態を反映していることが推察される。そこで、ヒスチジン修飾試薬 DEPC を用いて hPEPT1 の有するヒスチジン残基を化学修飾することにより^{9,18,42,57}、hPEPT1 による Gly-Sar の efflux におけるヒスチジン残基の役割について検討した。図 3.1.5 に示したように、hPEPT1 による基質の efflux activity は DEPC で処理することによって強く減弱した。しかし、DEPC 処理時に 10 mM Gly-Sar を共存させることによって efflux activity は保存された。このことは、hPEPT1 の有する DEPC 感受性のヒスチジン残基が efflux に関与していることを示し、更に hPEPT1 と基質の結合によって化学修飾から保護されたことからこのヒスチジン残基は細胞外側の基質認識部位近傍に位置することが予想された。

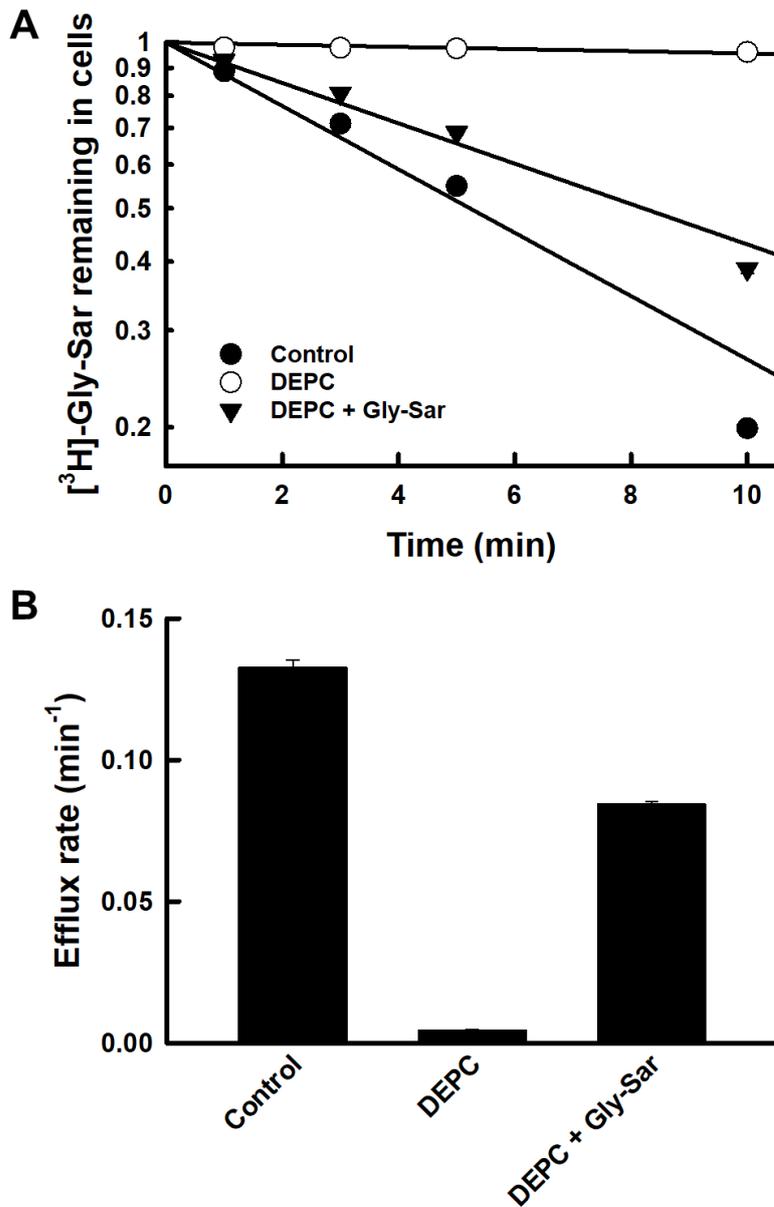


図 3.1.5 DEPC によるヒスチジン残基の化学修飾が hPEPT1 による Gly-Sar efflux に与える影響

CHO/hPEPT1 に³H]-Gly-Sar を pre-load した後、10mM Gly-Sar 存在下あるいは非存在下、pH 6、4°Cにおいて 10 min、1 mM DEPC で処理することにより化学修飾を行った。pH 7.4、37°Cにおいて efflux を測定し、A は pre-load した³H]-Gly-Sar の細胞内残存量の経時変化、B はその際の efflux rate を示す。(mean ± S.E., n = 6)

3.1.5 小括

以上より、hPEPT1 を介した基質の efflux は基質の化学ポテンシャルに従う促進拡散であり、その細胞外 pH 依存性はあるヒスチジン残基側鎖の解離状態の変化によるものであることが明らかとなった。また、DEPC を用いた hPEPT1 の有するヒスチジン残基の化学修飾によって、このヒスチジン残基は細胞外側の基質認識部位の近傍に位置することが推測された。hPEPT1 の細胞外側に位置するヒスチジン残基の中で、第 2 番目の推定膜貫通領域に存在する His57 はプロトンの結合・解離に関与するアミノ酸残基⁵⁷⁻⁶¹、第 4 番目の推定膜貫通領域に存在する His121 は基質認識に関与するアミノ酸残基^{57, 59, 61}であることがそれぞれ明らかとなっている。efflux 過程において基質は細胞内側で認識されるため、このヒスチジン残基は基質認識に関与しないことが推察される。このことより pH 依存的な輸送活性調節をおこなうアミノ酸残基は His57 である可能性が高く、His57 残基側鎖の解離状態に依存した輸送サイクルからの逸脱という機構が存在することが示唆された。

基質輸送後に輸送体が自身の基質認識部位の向きを初期状態に戻す速度（再配向速度）について、基質が負荷された状態の輸送体の方が空の状態の輸送体よりも速いことが経験的に分かっている。このことは *trans-stimulation* 現象によって説明され^{18, 19, 62}、膜ベシクルあるいは細胞に基質を負荷した後、さらにその反対側から別の基質を添加すると輸送体を介してそれぞれの基質の uptake あるいは efflux が促進されるというものである。CHO/hPEPT1 における [³H]-Gly-Sar の efflux rate は過剰量の Gly-Sar の添加によって増大した（図 3.1.1）。これは過剰量の Gly-Sar の添加によって輸送体の外向き状態から内向き状態へのコンホメーション変化が促進され、efflux 可能な内向き状態の輸送体数が増加したことによるものであると考えられる。このことから、輸送体の再配向は輸送サイクルにおける律速段階であり、再配向速度が輸送体の全輸送活性を決定していることが示唆された。したがって、細胞外 pH の低下による efflux activity の低下はある 1 つのヒスチジン残基のプロトン化によって輸送

体の再配向速度が低下し、efflux 可能な状態にある輸送体数が減少したことによって起こったと考えられ、図 3.1.6 に示したモデルのようにある 1 つのヒスチジン残基は輸送サイクルの活性化状態と不活性化状態を決める pH sensor として機能していることが推察された。Efflux activity はプロトンの電気化学ポテンシャルを消去した条件下においても不変であったが（図 3.1.4）、電気生理学的測定法を用いた基質輸送解析により基質の efflux に伴うプロトンの移動が報告されている⁵¹。このプロトンの移動が efflux 過程においてどのような影響を与えているかは今後も詳細な検討が必要である。

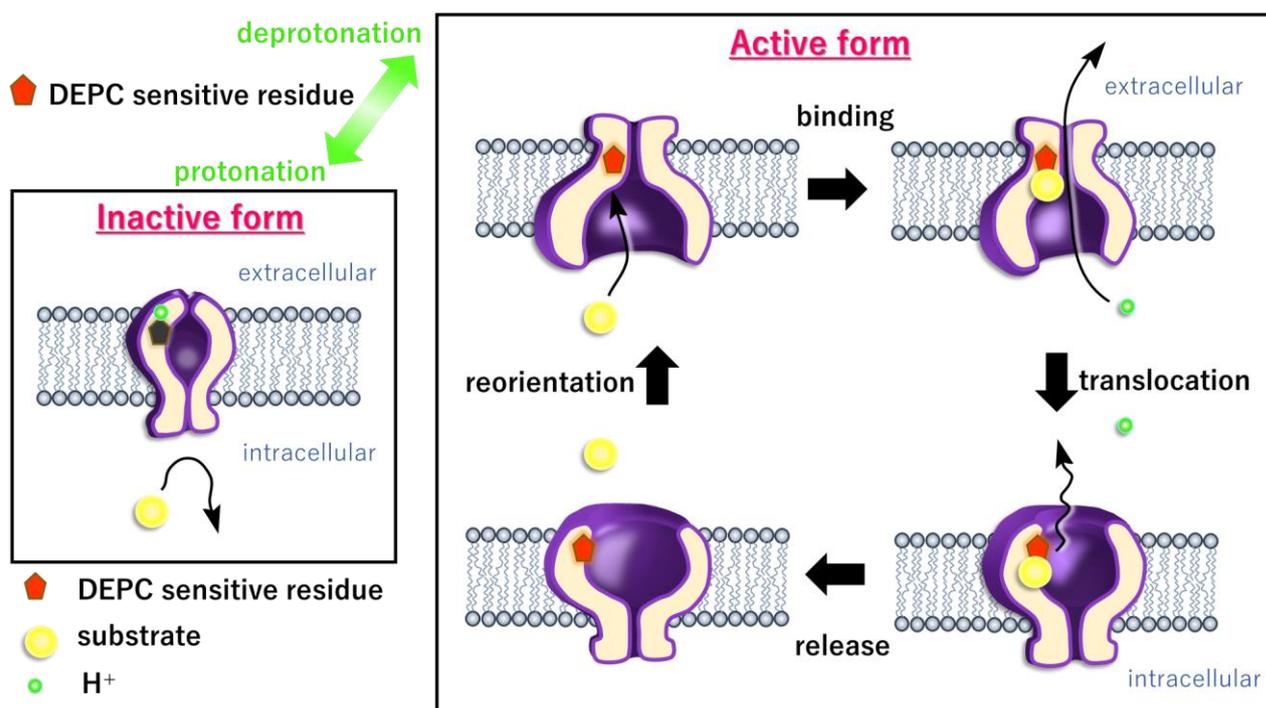


図 3.1.6 hPEPT1 を介した中性ジペプチドの efflux が細胞外 pH 依存性を示すメカニズム

Uptake と同様に efflux においても hPEPT1 の細胞外側の基質認識部位近傍にあるヒスチジン残基（DEPC sensitive residue）が pH sensor としてはたらき、その解離状態が細胞外 pH に依存して変化することで、基質輸送可能な active form と輸送停止状態の inactive form をとる。

3.2 YdgR タンパク質の基質認識機構の熱力学的説明⁷⁵

3.2.1 緒言

ヒト由来 PEPT の基質認識機構の解明は極めて難しい領域となっている。その原因として、ヒト由来 PEPT の結晶構造が解かれていない点と大量発現系が確立されていない点が挙げられる。近年 *Shewanella oneidensis* 由来のオリゴペプチド輸送担体 PepT_{So}^{39, 78} をはじめとしてバクテリアオリゴペプチド輸送担体の結晶構造が明らかとなってきた^{44, 63-65, 72, 73, 76, 79-86}。バクテリアオリゴペプチド輸送担体はヒト由来 PEPT と機能的にも構造的にも類似していることが明らかとなっていることから⁴¹、ヒト由来 PEPT のモデル輸送担体として基質認識機構の解明に有用であると考えられている。YdgR は、*Salmonella typhimurium* 菌由来 tppB の大腸菌ホモログとして同定され、hPEPT1 と類似の動態学的特性を示すことが分かっている⁴³。本研究では当研究室で大量発現系の確立されている大腸菌由来の YdgR を hPEPT1 のモデル輸送担体として物理化学的手法により、基質認識に関与する物理化学的因子を同定した。YdgR と基質間に働く非共有結合相互作用を定量的に検討するため、本研究では等温滴定型熱量計 (ITC) を用いて熱力学的な結合解析を行った。ITC はリガンドの標識や固定化を必要せず、天然に近い環境下で熱力学的パラメータ (化学量論比 (N)、結合定数 (K_a)、エンタルピー変化 (ΔH)、エントロピー変化 (ΔS)) を求めることができる。測定には高濃度あるいは多量の試料を要するため ITC は高親和性の結合反応系のみにも有用であると考えられてきたが、Turnbull らにより低親和性の結合反応系においても精度良く解析できる条件が確立されている⁶⁶。ITC を用いて YdgR とジペプチドとの結合による熱量変化を測定し、熱力学的パラメータを算出した。基質には、Val-Xxx、Xxx-Val 配列をもつジペプチドを用いた (Xxx は Ala、Ser、Phe、Tyr、Val を示す)。さらに、YdgR の結晶構造を用いたドッキングシミュレーションにより、ジペプチド及びペプチド類似薬物の結合型構造並びにジペプ

チド結合部位の水分子配置を予測した。それにより基質認識の多様性メカニズムの一つとして基質結合における水和水のダイナミックな変化が明らかになった。

3.2.2 等温滴定型熱量計 (ITC) を用いた基質ジペプチド Val-Ala と YdgR との結合に伴う熱量変化の測定

pET システム (Novagen) を用いて大腸菌 BL21 (DE3) 株に YdgR タンパク質を大量発現させた (~2 mg/L 培養液)。細胞膜画分を *n*-dodecyl- β -D-maltopyranoside で可溶化後、Ni アフィニティーカラムにより YdgR を精製した。SDS-PAGE CBB 染色 (図 3.2.1 A) 及び Western blotting (図 3.2.1 B) にて、35~40 kDa 付近に強いバンドが検出されたことより YdgR タンパク質が精製できていることを確認できた。

等温滴定型熱量計 (ITC (MicroCal)) によりジペプチド結合に伴う熱量変化を測定した。

図 3.2.2 に示すように、Val-Ala と YdgR との結合に伴う熱量変化は吸熱変化を示した。この基質結合に伴う結合熱量変化を one-site binding model にて解析を行い、 $N = 1$ と仮定して結合定数 (K_d)、エンタルピー変化 (ΔH)、エントロピー変化 (ΔS) を算出した結果、 $\Delta H > 0$ 、 $\Delta S > 0$ であったことからエントロピー駆動型の結合反応であることが示された。Slei らは、ITC を用いることにより、オリゴペプチド結合タンパク質 (OppA) が基質結合の際の基質結合部位における水和水分子の放出によって多様な基質認識性を獲得し、その水和水の放出はエントロピーの増大を伴うことを明らかにした^{67,68}。OppA は、オリゴペプチド輸送担体 (Opp) のペプチド受容体として機能し、幅広い種類のオリゴペプチドを認識する⁶⁹。基質特異性の高い輸送担体における基質結合は主に水素結合やイオン結合が関与し、その結合熱量変化は発熱変化であることから⁷⁰、この点が YdgR の基質認識における多様性の機構の 1 つではないかと推察された。

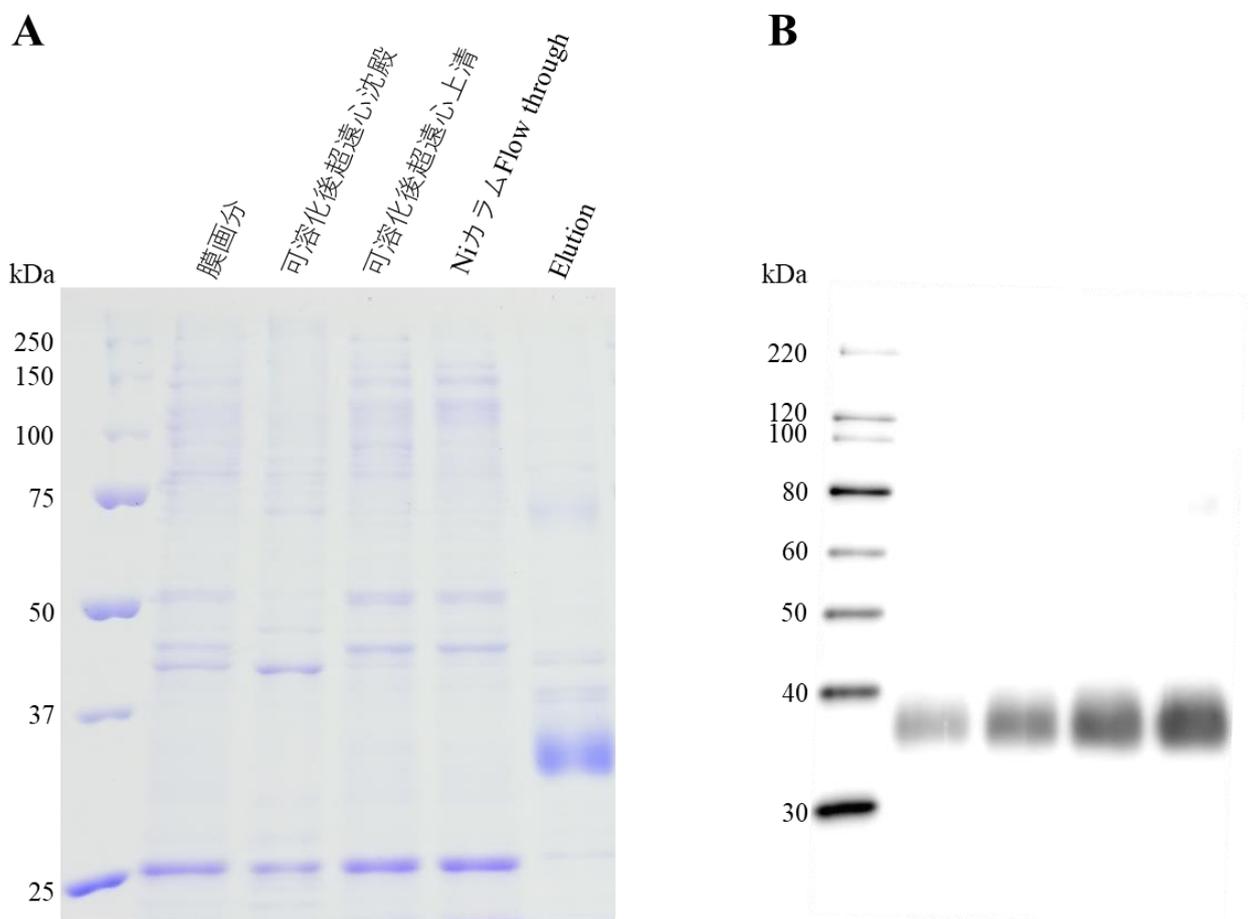


図 3.2.1 YdgR の精製

A は精製各過程のサンプル 7.0 μg を 10% SDS-PAGE にかき、CBB 染色した結果、B は溶出画分の Western blotting (左から 10, 20, 40, 60 ng/well)を示す。

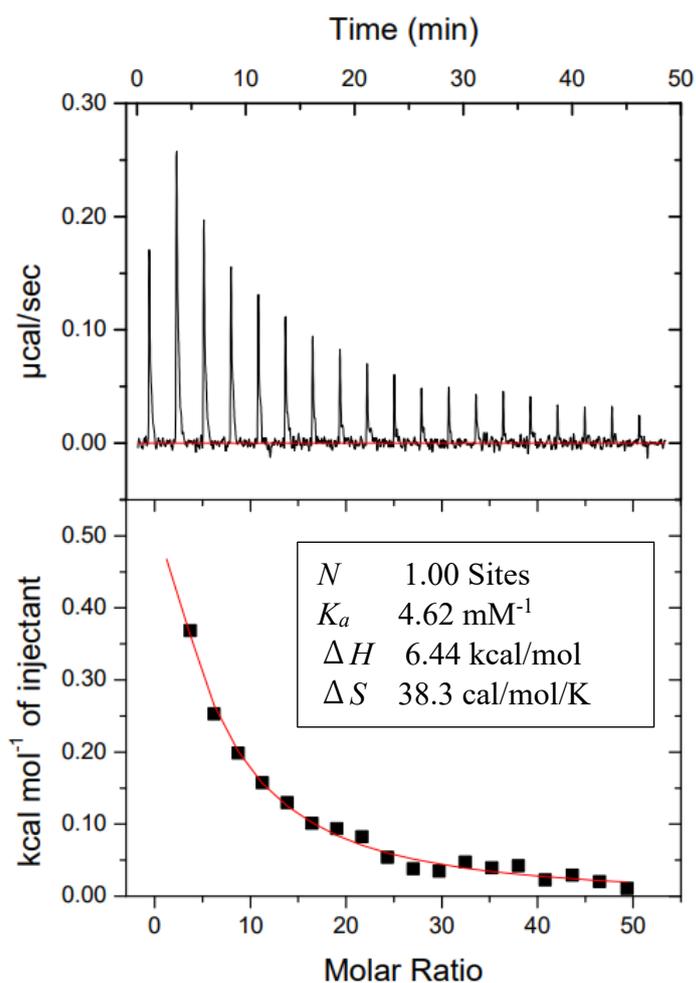


図 3.2.2 YdgR への Val-Ala 結合の ITC 解析結果

上段は YdgR への Val-Ala 結合に伴う熱量変化。下段は基質がバッファーに滴定された際の希釈熱量を差し引いた YdgR と Val-Ala との滴定毎の積算熱量を、Val-Ala と YdgR のモル比に対してプロットしたものであり、実線は YdgR と基質が 1:1 の結合であると仮定したときの回帰曲線を示す。挿入図は算出した熱力学的パラメータを示す。

3.2.3 基質結合に伴う YdgR の熱力学的変化

基質多様性の熱力学的機構を解明するために、様々な Val-Xxx、Xxx-Val ジペプチドを用いて、YdgR との結合に伴う熱量変化を測定した。その結果、Phe-Val を除き、すべてのジペプチドが吸熱反応を示した。そのペプチドの配列の違いにより熱量変化の大きさは異なるが、 ΔH 、 ΔS は共に正の値を示した (表 3.2.1)。このことから、YdgR とジペプチドとの結合反応は、エントロピー駆動型の結合反応であることが考えられ、主に水和水の放出を伴う疎水性相互作用によって駆動することが推察された。 ΔG は ΔH の値によらず一定であったが、 ΔH と ΔS との間には強い正の相関が見られた (図 3.2.3)。これは数多くの反応系や平衡系においてみられるエンタルピー・エントロピー補償則であると考えられ、y 切片は脱溶媒和エントロピーを示す⁷⁾。y 切片は 5.44 kcal/mol と算出され、 ΔG (-6.3~-4.7 kcal/mol) と大差ないことより、YdgR とジペプチドとの結合は大部分が脱溶媒和によるものであることが分かった。すなわち、この基質結合に伴う大きな正のエントロピーは、YdgR への基質結合の際の基質結合部位に存在する水和水の放出が大きく寄与すると考えられる。ただし、 ΔS には他にもタンパク質のダイナミックな構造変化に伴ったアミノ酸残基の自由度の変化、基質結合部位における水和水の変化等様々な要因が考えられた。

dipeptide (number of measurements)	pH	K_D (mM)	ΔG (kcal mol ⁻¹)	ΔH (kcal mol ⁻¹)	$T\Delta S$ (kcal mol ⁻¹)
VA (6)	6.19±0.05	0.182±0.015	-5.10±0.05	7.49±0.60	12.6±0.64
VS (4)	6.09±0.05	0.368±0.097	-4.73±0.14	4.05±0.39	8.78±0.48
VF (4)	6.15±0.05	0.026±0.001	-6.25±0.03	7.47±0.72	13.7±0.73
VY (4)	6.12±0.03	0.145±0.028	-5.27±0.14	4.22±0.38	9.50±0.24
VV (3)	6.14±0.05	0.084±0.012	-5.56±0.09	8.34±0.58	13.9±0.52
AV (7)	6.22±0.05	0.364±0.019	-4.69±0.03	11.1±0.71	15.8±0.73
SV (3)	6.09±0.07	0.343±0.015	-4.73±0.03	9.90±1.20	14.6±1.18
YV (4)	6.12±0.03	0.132±0.008	-5.29±0.04	7.35±0.40	12.6±0.38

表 3.2.1 YdgR と Val-Xxx、Xxx-Val ジペプチドとの結合熱力学パラメータ

熱力学的パラメータは、等温滴定曲線から YdgR とリガンドが 1:1 で結合すると仮定して one-site binding model により算出した。結合熱量変化の見られなかった Phe-Val は熱力学的パラメータを算出できなかったため除外している。(mean±S.E., n=3-7)

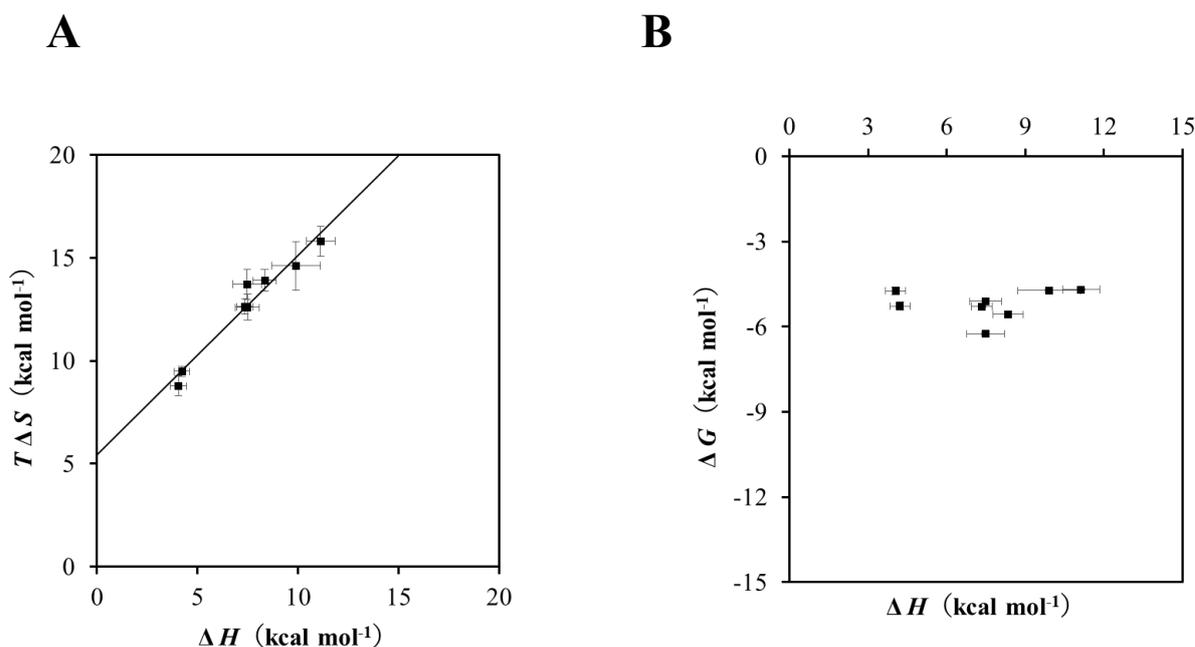


図 3.2.3 熱力学的パラメータの相関

A は ΔH と $T\Delta S$ の相関、B は ΔH と ΔG の相関を示す。直線回帰により B の傾きは 0.97、切片は 5.44 kcal mol⁻¹ と求まった。

3.2.4 YdgR の基質認識ポケットに存在する水和水の基質認識機構への関与

エントロピー駆動型基質認識における水和水の役割を解明するため、ITC の測定条件に近い pH 6.5 の YdgR の結晶構造⁴⁴を用いて基質結合型構造と基質結合部位における水分子配置をコンピューターシミュレーションにより予測した。YdgR はジペプチド結合型結晶構造が解かれておらず、また、結晶構造の分解能が低く水分子がほとんど見えていないことから、*Streptococcus thermophilus* 由来のオリゴペプチド輸送担体 PepT_{St}⁷² の結晶構造を手掛かりに予測を行った。PepT_{St} と YdgR の基質結合ポケットについて、図 3.2.4 の結晶構造の比較で示したように、サイズは異なるが、基質結合部位のアミノ酸配列相同性が高い (表 3.2.2)。したがって、PepT_{St} と YdgR のジペプチド結合様式は類似していることが推察される。

図 3.2.5 と図 3.2.6 は、明らかとなっている PepT_{St} のジペプチド結合型構造⁷²と基質結合部位における水分子の配置⁷²をコンピューターシミュレーションにより再現できるかを確認したものがある。図 3.2.5 に示すように Ala-Leu の docking 計算構造は結晶構造とほぼ一致していたことから、十分な精度をもってシミュレーションできていることが確認された。図 3.2.6 では Phe 側鎖およびカルボキシ基と水素結合する水分子がほぼ全て予測できていることが示された一方で、バルク側の水分子や cavity 表面に位置する水素結合していない水分子の予測精度が低かった。これらの水分子はエネルギー的に不安定で位置が固定されていないため結晶構造では検出できていないことが考えられる。したがって、結合ポケットにおける 3D-RISM 理論による水分子配置予測の精度は十分であり、本計算による水分子配置予測結果は、妥当であると考えられる。

図 3.2.7 の YdgR の基質結合部位における水分子の予測結果より、基質結合に伴い排除される水分子と基質結合部位のアミノ酸残基と水素結合を形成して基質の結合を媒介するアダプター水分子の存在が示唆された。Gly-Sar、セファドロキシル、バラシクロビルは、Phe-Val と同様に結合に伴う熱量変化が少なかった。図 3.2.8 の基質結合型構造の予測より、結合熱量変化の少なかった Phe-Val やセファドロキシルは吸熱変化の見られた基質とは全く異なる位置に結合することが考えられ、基質が多岐にわたる部位に結合することが示唆された。以上の結果から、排除水分子は結合に伴うエントロピーの増大、すなわち基質結合駆動力に寄与し、アダプターとして機能する水分子は基質結合部位の多様性をもたらしていることが考えられる。また、N 末側鎖と比較して C 末側鎖はバルク側を向いて結合する傾向が見られたことより、結合の際の基質の自由度の違いも ΔS に影響を及ぼすことが考えられた。

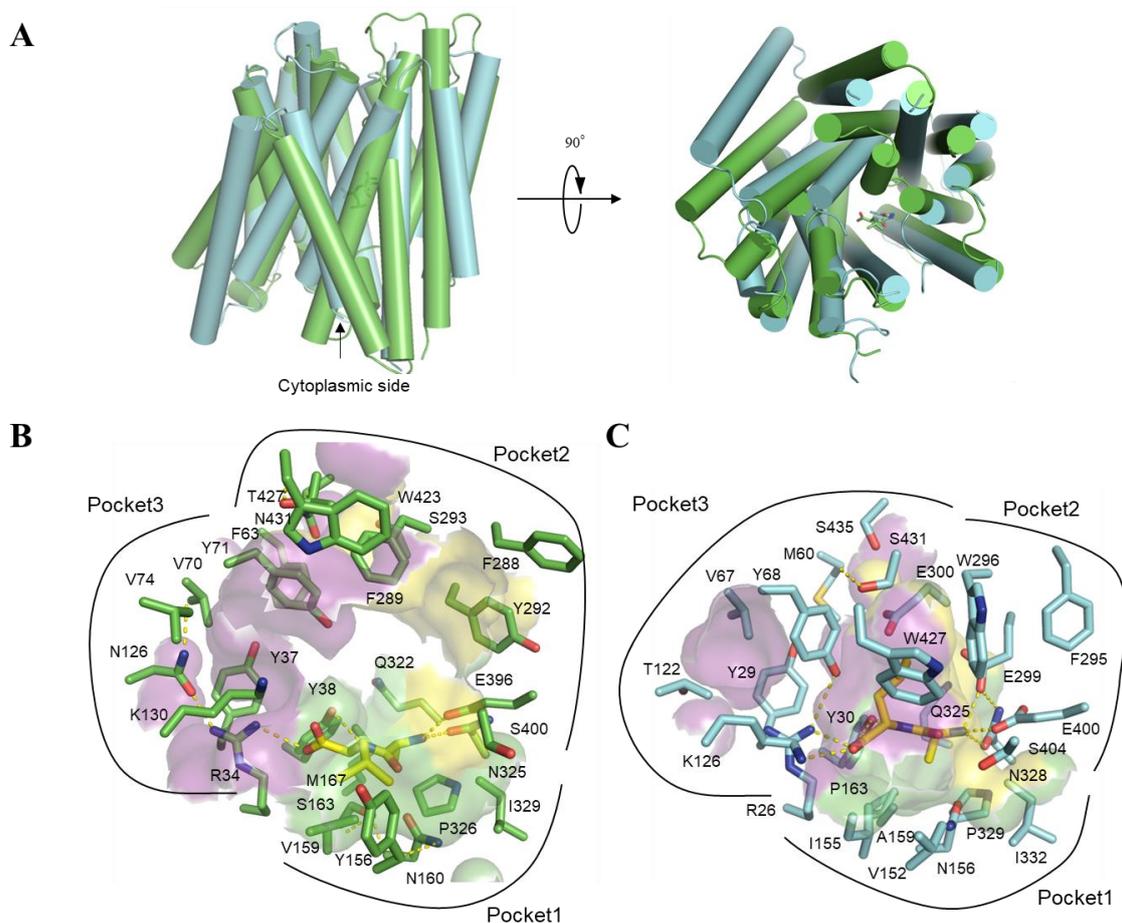


図 3.2.4 YdgR と PepT_{St} の基質結合部位

A は YdgR と PepT_{St}、それぞれの Ala-Leu docking 計算構造を重ね合わせたものであり、YdgR は緑色、PepT_{St} はシアン色で示す。Stick は docking した Ala-Leu を示し、緑色が YdgR、シアン色が PepT_{St} へ docking した Ala-Leu である。なお、PepT_{St} の Ala-Leu docking 計算構造は PepT_{St}Ala-Leu 結合型構造（結晶構造）から Ala-Leu を除去した構造に Ala-Leu を docking したものである。B は YdgR の基質結合部位であり、黄色 stick は docking した Ala-Leu を示す。C は PepT_{St} の基質結合部位であり、オレンジ stick は PepT_{St}Ala-Leu 結合型構造（結晶構造）の Ala-Leu を示す。YdgR の Ala-Leu docking 計算構造、PepT_{St} の Ala-Leu 結合型構造（結晶構造）から同定したそれぞれの基質結合部位をすでに明らかとなっている PepT_{St}⁷⁷ と PepT_{So2}

(*Shewanella oneidensis* 由来オリゴペプチド輸送担体)⁷⁶ のトリペプチド結合部位を参考に

3つのポケットに分けた (pocket 1、緑色；pocket 2、黄色；pocket 3、ピンク色)。

	Pocket 1												Pocket 2					Pocket 3									
YdgR	Y38	Y156	V159	N160	S163	M167	Q322	N325	P326	I329	E396	F288	F289	Y292	S400	T427	R34	Y37	F63	V70	Y71	V74	N126	K130	S293	W423	N431
PepT_{St}	Y30	V152	I155	N156	A159	P163	Q325	N328	P329	I332	E400	F295	W296	E299	S404	S431	R26	Y29	M60	V67	Y68	G71	T122	K126	E300	W427	S435

表 3.2.2 YdgR と PepT_{St} の基質結合部位のアミノ酸配列同一性

Figure 3.2.4 の Ala-Leu 結合型構造 (結晶構造) 及び Ala-Leu docking 計算構造により同定された3つの基質結合ポケット (pocket 1、pocket 2、pocket 3) において、YdgR と PepT_{St}、それぞれの基質結合ポケットを構成するアミノ酸残基を比較した。両者間で同一のアミノ酸残基は赤字で示し、アミノ酸側鎖の物理化学的性質が同じアミノ酸残基は色付けした (酸性アミノ酸、橙色；塩基性アミノ酸、青色；非荷電極性アミノ酸、緑色；非極性アミノ酸、灰色)。

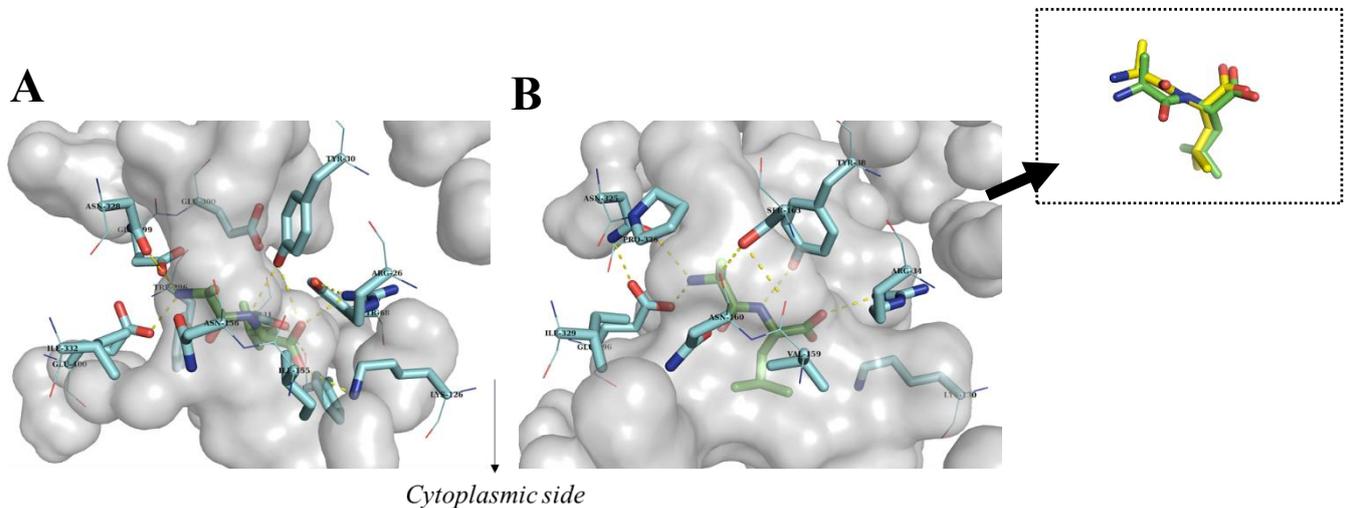


図 3.2.5 PepT_{St} Ala-Leu 結合型構造の予測 (結晶構造との比較)

A は YdgR Ala-Leu docking 計算構造、B は PepT_{St} docking 計算構造を示す。B は PepT_{St} Ala-Leu 結合型構造から Ala-Leu を除去した構造に Ala-Leu を docking したものである。点線で

囲った図は、Ala-Leu の結晶構造（黄色 stick）と docking 計算構造（緑色 stick）との比較である。基質結合部位のアミノ酸残基のうち Ala-Leu と水素結合を形成するアミノ酸残基をシアン色 stick で示し、それぞれのアミノ酸のラベルを 3 文字表記で表示した。

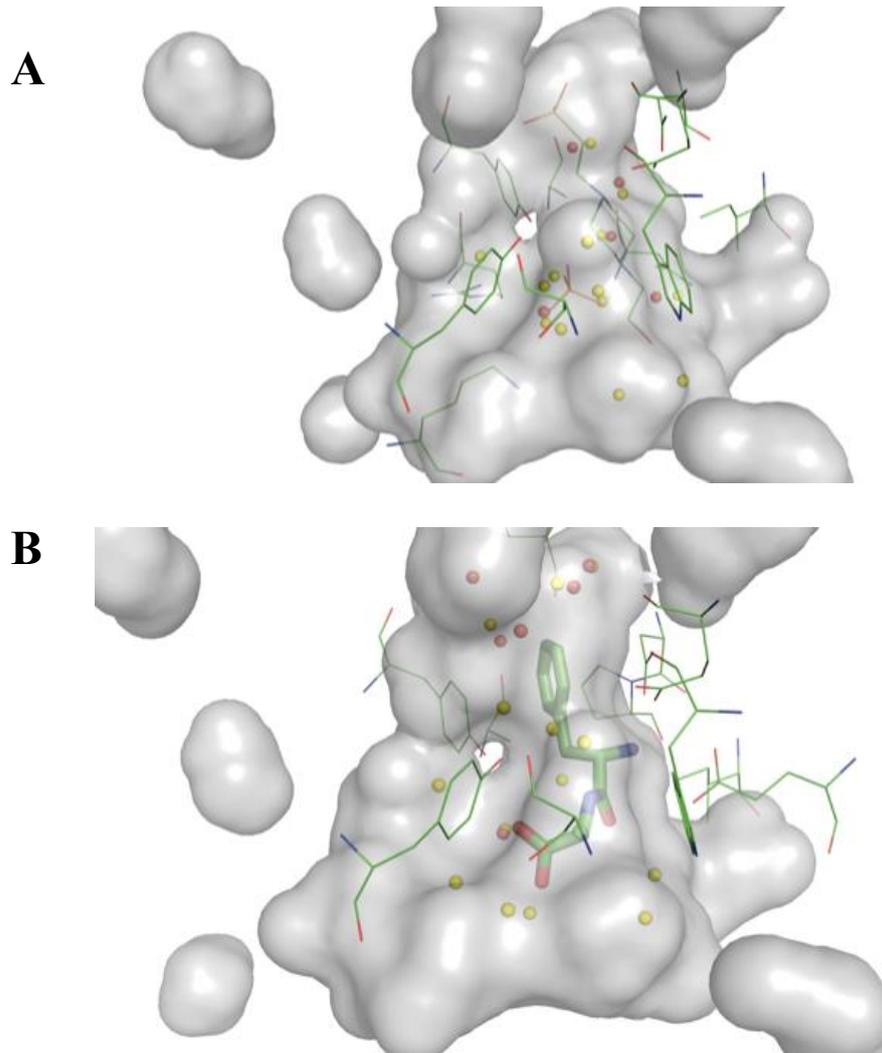


図 3.2.6 PepT_{St} 基質結合部位の水分子予測（結晶構造との比較）

A は基質非結合型構造の水分子予測配置、B は Phe-Ala 結合型構造水分子予測配置を示す。PepT_{St} に結合した Phe-Ala は緑色 stick、結晶構造の水分子は赤色 sphere、3D-RISM によ

り予測した水分子は黄色 sphere で示す。Cavity 上部の水分子は、ほぼ全て予測できている。一部、結晶構造で検出されていない水分子が存在しているが、これらの多くはバルクに接しているまたは cavity 表面に位置する水素結合していない水分子である。

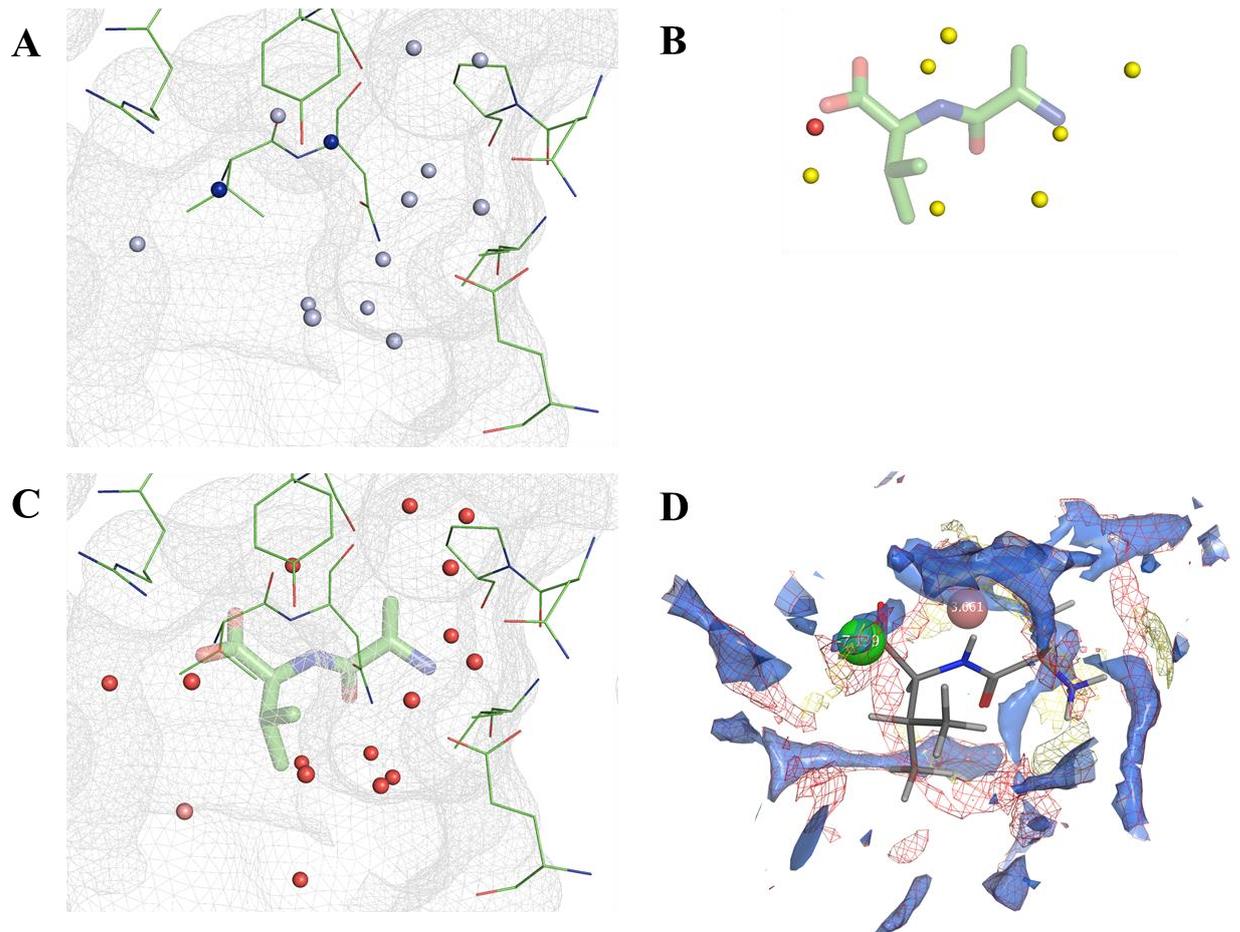


図 3.2.7 基質結合に伴う YdgR 基質結合部位における水分子の変動予測

A は基質非結合型構造における水分子（薄い青色 sphere と青色 sphere）の予測配置であり、2 個の水分子（青色 sphere）が Ala-Val 結合に伴い排除された。B は遊離の Ala-Val 結合水分子（黄色 sphere と赤色 sphere）の予測配置であり、1 個の水分子（赤色 sphere）は YdgR への結合後も排除されずに Ala-Val に保持されたままであった。C は Ala-Val 結合型構造における水分子（ピンク色 sphere と赤色 sphere）の予測配置であり、1 個の水分子（ピ

ンク色 sphere) は結合に伴い新たに出現した水分子を示す。D は水の密度分布であり、青色 solid は A、黄色 mesh は B、赤色 mesh は C の構造における水分子の確率密度を示す。また、排除されると予想された 2 個の水分子の溶媒和自由エネルギー (ΔG) が正の場合は赤色、負の場合は緑色に色分けした。 ΔG が負の場合は基質が結合していない時に安定して存在している水分子であることを示し、排除されるのに大きなエネルギーを要する。排除するためには、大きなエネルギー損失を補うエネルギー利得が必要となり、ジペプチドのカルボキシ基と Arg34 との水素結合がそのエネルギー損失を補っていると考えられる。一方、 ΔG が正の場合は、疎水性相互作用により排除されやすい水分子と考えられる。

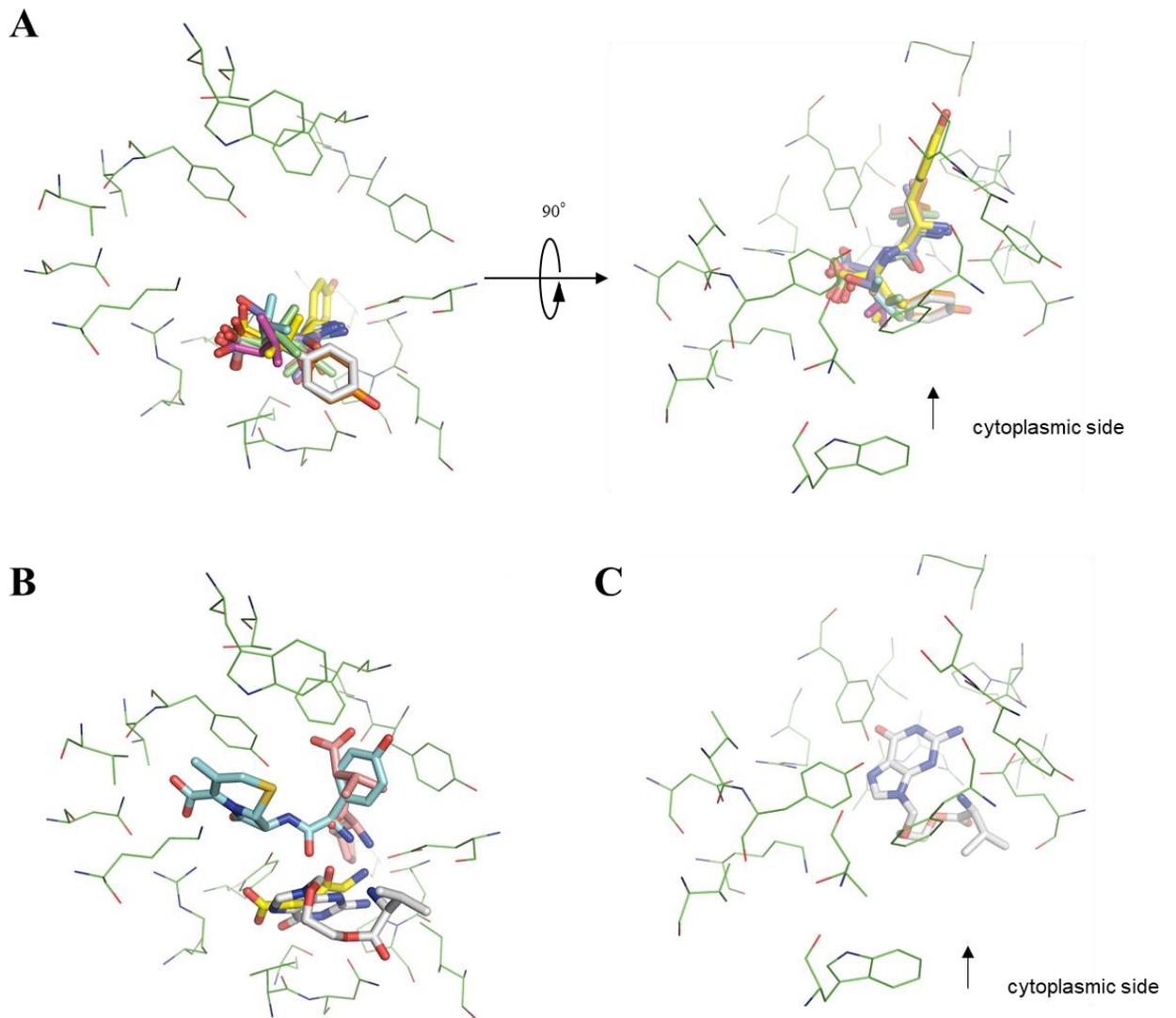


図 3.2.8 YdgR 基質結合部位における吸熱変化の見られた基質と結合熱量変化の少ない基質の結合位置の比較

A は吸熱変化の見られた基質 (Phe-Val を除く Val-XXX、XXX-Val ジペプチド) のドッキング構造 (左側、細胞質側から見た基質結合部位; 右側、膜に対して平行に見た基質結合部位)、B は結合熱量変化の少ない基質 (Phe-Val、Gly-Sar、セファドロキシル、バラシクロビル) のドッキング構造 (細胞質側から見た基質結合部位)、C はバラシクロビルドッキング構造

(膜に対して平行に見た基質結合部位)を示す。リガンドは stick で示し、色分けは次の通り。

吸熱変化の見られた基質 (A) : Val-Ala、サーモン色 ; Val-Phe、シルバー色 ; Val-Ser、スレートブルー色 ; Val-Tyr、橙色 ; Val-Val、薄緑色 ; Ala-Val、シアン色 ; Ser-Val、マゼンタ色 ; Tyr-Val、黄色。結合熱量変化の少ない基質 (B・C) : セファドロキシル、シアン色 ; Phe-Val、ピンク色 ; Gly-Sar、黄色 ; バラシクロビル、シルバー色。

3.2.5 小括

ITC を用いた熱力学的結合解析により、YdgR とジペプチドとの結合熱量変化は吸熱変化であり、その結合反応はエントロピー駆動型であることが明らかとなった。また、基質結合に伴って排除される水分子と基質結合部位に保持されたままの水分子が存在することが示唆され、前者は結合駆動力、後者は基質結合を媒介するアダプターとして機能することが推察された。後者に関しては YdgR の基質結合が多岐に渡る要因となっており、その存在により多様な結合様式を可能にしていることが考えられる。これらのことから基質結合部位に存在する水和水は、YdgR の多彩な基質認識を可能にする物理化学的因子であることが示唆された。

第 4 章 総括

4.1 結論

輸送サイクルにおける重要な因子、pH 依存的輸送活性調節因子と基質認識における重要な物理化学的因子について検討を行った結果、以下のことが明らかとなった。

- ・ hPEPT1 を介した基質の efflux は uptake と同様に細胞外 pH に依存した His57 残基側鎖の解離状態の変化によって制御されることが示唆された。
- ・ Ydgr 基質結合部位に水和した水分子は基質結合駆動力あるいは基質結合を媒介するアダプターとして基質認識に多様性をもたらすことが示唆された。

4.2 展望

本研究では、pH 依存性オリゴペプチド輸送担体の輸送機構と基質認識機構の両者において重要な因子を同定した。

輸送機構については hPEPT1 安定大量発現細胞 CHO/hPEPT1 を用い、hPEPT1 を介した Gly-Sar の efflux が uptake 同様に細胞外ヒスチジン残基側鎖の解離状態によって pH 依存的に制御されることが明らかとなった。hPEPT1 と構造的にも機能的にも類似していることが明らかとなっている PepT_{So} において、His 57 と等価なアミノ酸残基である His 61 を Asp へ変異させた場合、最大輸送活性をとなる pH がより酸性側へシフトしたとの報告があり⁷³、His 61 がプロトンの結合・解離部位として機能し、pH 依存的に輸送活性を制御していることが考えられる。hPEPT1 の基質輸送可能な active form と inactive form を決定するヒスチジン残基は His57 であると予想されるが、His57 に変異を加えて機能を解析することができないため、今後は周辺残基との相互作用の変化も含めその詳細を検討していく必要がある。また、hPEPT1 の基質輸送機構を解析するにあたって、電荷的に中性な基質である Gly-Sar を用いたが、負の電荷を持つ基質では pH profile が酸性側に、正の電荷を持つ基質では pH profile がアルカリ性側にシフトすることが報告されており³²、この電荷を持つ基質の pH

profile のシフトも His 57 残基が引き起こしている可能性が考えられる。このことに関しては、hPEPT1 の基質輸送サイクルを解明する次のステップとして、様々な電荷を持つ基質の輸送の細胞外 pH 依存性を解析することで検討していく。

続いて、基質認識機構については hPEPT1 モデル輸送担体である大腸菌由来の YdgR を用い、YdgR とジペプチドとの結合反応がエントロピー駆動型であること、結合に伴うエントロピーの増大は基質結合の際に排除される水分子に起因することを明らかにした。また、基質結合を媒介するアダプターとしての役目を果たす水分子の存在が示唆され、YdgR の基質結合が多岐に渡る要因となっていることも考えられた。POTs は、ペプチド側鎖の結合部位のアミノ酸残基はペプチド主鎖の結合部位と比較して保存性が低いにもかかわらず、ほぼすべてのジペプチド、トリペプチドを認識する寛容な基質認識性を持つ。Molledo らは、PepT_{St} のジペプチド結合型結晶構造から基質結合部位の水分子が特にペプチド側鎖の認識に重要な役割を果たすことを明らかにした⁷²。YdgR の結晶構造には水分子がほとんど見られていないが、PepT_{St} と同様に基質結合部位に存在する水和水が YdgR の多彩な基質認識を可能にしていると考えられる。本研究においては pH 6 の酸性条件下にて結合解析を行い、基質結合の際の排除水分子がジペプチドの主な結合駆動力となることが明らかとなったが、今後は pH を変化させた場合においても同様の検証を行い、基質認識における水分子の役割についてさらに詳細に検討する。

参考文献

- 1) Naruhashi K, Tamai I, Li Q, Sai Y, and Tsuji A. Experimental demonstration of the unstirred water layer effect on drug transport in Caco-2 cells. *J Pharm Sci.*, **92**, 1502-1508 (2003).
- 2) Shiau YF, Fernandez P, Jackson MJ, and McMonagle S. Mechanisms maintaining a low-pH microclimate in the intestine. *Am J Physiol.*, **248**, G608-617 (1985).
- 3) Brant SR, Yun CH, Donowitz M, and Tse CM. Cloning, tissue distribution, and functional analysis of the human Na⁺/N⁺ exchanger isoform, NHE3. *Am J Physiol.*, **269**, C198-206 (1995).
- 4) Hoogerwerf WA, Tsao SC, Devuyst O, Levine SA, Yun CH, Yip JW, Cohen ME, Wilson PD, Lazenby AJ, Tse CM, and Donowitz M. NHE2 and NHE3 are human and rabbit intestinal brush-border proteins. *Am J Physiol.*, **270**, G29-41 (1996).
- 5) Anderson CM, Grenade DS, Boll M, Foltz M, Wake KA, Kennedy DJ, Munck LK, Miyauchi S, Taylor PM, Campbell FC, Munck BG, Daniel H, Ganapathy V, and Thwaites DT. H⁺/amino acid transporter 1 (PAT1) is the imino acid carrier: An intestinal nutrient/drug transporter in human and rat. *Gastroenterology.*, **127**, 1410-1422 (2004).
- 6) Kennedy DJ, Leibach FH, Ganapathy V, and Thwaites DT. Optimal absorptive transport of the dipeptide glycylsarcosine is dependent on functional Na⁺/H⁺ exchange activity. *Pflugers Arch.*, **445**, 139-146 (2002).
- 7) Thwaites DT, and Anderson CM. H⁺-coupled nutrient, micronutrient and drug transporters in the mammalian small intestine. *Exp Physiol.*, **92**, 603-619 (2007).
- 8) Ganapathy V, and Leibach FH. Role of pH gradient and membrane potential in dipeptide transport in intestinal and renal brush-border membrane vesicles from the rabbit. Studies with L-carnosine and glycyl-L-proline. *J Biol Chem.*, **258**, 14189-14192 (1983).
- 9) Miyamoto Y, Ganapathy V, and Leibach FH. Identification of histidyl and thiol groups at the active site of rabbit renal dipeptide transporter. *J Biol Chem.*, **261**, 16133-16140 (1986).
- 10) Shawki A, Engevik MA, Kim RS, Knight PB, Baik RA, Anthony SR, Worrell RT, Shull GE, and Mackenzie B. Intestinal brush-border Na⁺/H⁺ exchanger-3 drives H⁺-coupled iron absorption in the mouse. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.*, **311**, G423-430 (2016).
- 11) Fei YJ, Kanai Y, Nussberger S, Ganapathy V, Leibach FH, Romero MF, Singh SK, Boron WF, and Hediger MA. Expression cloning of a mammalian proton-coupled oligopeptide transporter. *Nature.*, **368**, 563-566 (1994).
- 12) Daniel H, Spanier B, Kottra G, and Weitz D. From bacteria to man: archaic proton-dependent peptide transporters at work. *Physiology (Bethesda).*, **21**, 93-102 (2006).

- 13) Döring F, Will J, Amasheh S, Clauss W, Ahlbrecht H, and Daniel H. Minimal molecular determinants of substrates for recognition by the intestinal peptide transporter. *J Biol Chem.*, **273**, 23211-23218 (1998).
- 14) Brandsch M, Knütter I, and Leibach FH. The intestinal H⁺/peptide symporter PEPT1: structure-affinity relationships. *Eur J Pharm Sci.*, **21**, 53-60 (2004).
- 15) Viennois E, Pujada A, Zen J, and Merlin D. Function, Regulation, and Pathophysiological Relevance of the POT Superfamily, Specifically PepT1 in Inflammatory Bowel Disease. *Compr Physiol.*, **8**, 731-760 (2018).
- 16) Naruhashi K, Sai Y, Tamai I, Suzuki N, and Tsuji A. PepT1 mRNA expression is induced by starvation and its level correlates with absorptive transport of cefadroxil longitudinally in the rat intestine. *Pharm Res.*, **19**, 1417-1423 (2002).
- 17) Tsuji A, Nakashima E, Kagami I, and Yamana T. Intestinal absorption mechanism of amphoteric beta-lactam antibiotics I: Comparative absorption and evidence for saturable transport of amino-beta-lactam antibiotics by in situ rat small intestine. *J Pharm Sci.*, **70**, 768-772 (1981).
- 18) Kato M, Maegawa H, Okano T, Inui K, and Hori R. Effect of various chemical modifiers on H⁺ coupled transport of cephradine via dipeptide carriers in rabbit intestinal brush-border membranes: role of histidine residues. *J Pharmacol Exp Ther.*, **251**, 745-749 (1989).
- 19) Yuasa H, Amidon GL, and Fleisher D. Peptide carrier-mediated transport in intestinal brush border membrane vesicles of rats and rabbits: cephradine uptake and inhibition. *Pharm Res.*, **10**, 400-404 (1993).
- 20) Wenzel U, Thwaites DT, and Daniel H. Stereoselective uptake of beta-lactam antibiotics by the intestinal peptide transporter. *Br J Pharmacol.*, **116**, 3021-3027 (1995).
- 21) Bretschneider B, Brandsch M, and Neubert R. Intestinal transport of beta-lactam antibiotics: analysis of the affinity at the H⁺/peptide symporter (PEPT1), the uptake into Caco-2 cell monolayers and the transepithelial flux. *Pharm Res.*, **16**, 55-61 (1999).
- 22) Leibach FH, and Ganapathy V. Peptide transporters in the intestine and the kidney. *Annu Rev Nutr.*, **16**, 99-119 (1996).
- 23) Thwaites DT, Cavet M, Hirst BH, and Simmons NL. Angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitor transport in human intestinal epithelial (Caco-2) cells. *Br J Pharmacol.*, **114**, 981-986 (1995).
- 24) Inui K, Tomita Y, Katsura T, Okano T, Takano M, and Hori R. H⁺ coupled active transport of bestatin via the dipeptide transport system in rabbit intestinal brush-border membranes. *J Pharmacol Exp Ther.*, **260**, 482-486 (1992).

- 25) Ganapathy ME, Huang W, Wang H, Ganapathy V, and Leibach FH. Valacyclovir: a substrate for the intestinal and renal peptide transporters PEPT1 and PEPT2. *Biochem Biophys Res Commun.*, **246**, 470-475 (1998).
- 26) Sugawara M, Huang W, Fei YJ, Leibach FH, Ganapathy V, and Ganapathy ME. Transport of valganciclovir, a ganciclovir prodrug, via peptide transporters PEPT1 and PEPT2. *J Pharm Sci.*, **89**, 781-789 (2000).
- 27) Payne JW, Grail BM, and Marshall NJ. Molecular recognition templates of peptides: driving force for molecular evolution of peptide transporters. *Biochem Biophys Res Commun.*, **267**, 283-289 (2000).
- 28) Bailey PD, Boyd CA, Bronk JR, Collier ID, Meredith D, Morgan KM, and Temple CS. How to Make Drugs Orally Active: A Substrate Template for Peptide Transporter PepT1. *Angew Chem Int Ed Engl.*, **39**, 505-508 (2000).
- 29) Meredith D, Temple CS, Guha N, Sword CJ, Boyd CA, Collier ID, Morgan KM, and Bailey P D. Modified amino acids and peptides as substrates for the intestinal peptide transporter PepT1. *Eur J Biochem.*, **267**, 3723-3728 (2000).
- 30) Bolger MB, Haworth IS, Yeung AK, Ann D, von Grafenstein H, Hamm-Alvarez S, Okamoto, CT, Kim KJ, Basu SK, Wu S, and Lee VH. Structure, function, and molecular modeling approaches to the study of the intestinal dipeptide transporter PepT1. *J Pharm Sci.*, **87**, 1286-1291 (1998).
- 31) Brandsch M, Thuncke F, Küllertz G, Schutkowski M, Fischer G, and Neubert K. Evidence for the absolute conformational specificity of the intestinal H⁺/peptide symporter, PEPT1. *J Biol Chem.*, **273**, 3861-3864 (1998).
- 32) Mackenzie B, Fei YJ, Ganapathy V, and Leibach FH. The human intestinal H⁺/oligopeptide cotransporter hPEPT1 transports differently-charged dipeptides with identical electrogenic properties. *Biochim Biophys Acta.*, **1284**, 125-128 (1996).
- 33) Amasheh S, Wenzel U, Boll M, Dorn D, Weber W, Clauss W, and Daniel H. Transport of charged dipeptides by the intestinal H⁺/peptide symporter PepT1 expressed in *Xenopus laevis* oocytes. *J Membr Biol.*, **155**, 247-256 (1997).
- 34) Steel A, Nussberger S, Romero MF, Boron WF, Boyd CA, and Hediger MA. Stoichiometry and pH dependence of the rabbit proton-dependent oligopeptide transporter PepT1. *J Physiol.*, **498**, 563-569 (1997).
- 35) Kottra G, and Daniel H. Bidirectional electrogenic transport of peptides by the proton-coupled carrier PEPT1 in *Xenopus laevis* oocytes: its asymmetry and symmetry. *J Physiol.*, **536**, 495-503 (2001).

- 36) Kottra G, Stamford A, and Daniel H. PEPT1 as a paradigm for membrane carriers that mediate electrogenic bidirectional transport of anionic, cationic, and neutral substrates. *J Biol Chem.*, **277**, 32683-32691 (2002).
- 37) Perland E, and Fredriksson R. Classification Systems of Secondary Active Transporters. *Trends Pharmacol Sci.*, **38**, 305-315 (2017).
- 38) Yan N. Structural advances for the major facilitator superfamily (MFS) transporters. *Trends Biochem Sci.*, **38**, 151-159 (2013).
- 39) Newstead S, Drew D, Cameron AD, Postis VL, Xia X, Fowler PW, Ingram JC, Carpenter EP, Sansom MS, McPherson MJ, Baldwin SA, and Iwata S. Crystal structure of a prokaryotic homologue of the mammalian oligopeptide-proton symporters, PepT1 and PepT2. *EMBO J.*, **30**, 417-426 (2011).
- 40) Jardetzky O. Simple allosteric model for membrane pumps. *Nature.*, **211**, 969-970 (1966).
- 41) Newstead S. Molecular insights into proton coupled peptide transport in the PTR family of oligopeptide transporters. *Biochim Biophys Acta.*, **1850**, 488-499 (2015).
- 42) Fujisawa Y, Tateoka R, Nara T, Kamo N, Taira T, and Miyauchi S. The extracellular pH dependency of transport activity by human oligopeptide transporter 1 (hPEPT1) expressed stably in Chinese hamster ovary (CHO) cells: a reason for the bell-shaped activity versus pH. *Biol Pharm Bull.*, **29**, 997-1005 (2006).
- 43) Weitz D, Harder D, Casagrande F, Fotiadis D, Obrdlik P, Kelety B, and Daniel H. Functional and structural characterization of a prokaryotic peptide transporter with features similar to mammalian PEPT1. *J Biol Chem.*, **282**, 2832-2839 (2007).
- 44) Ural-Blimke Y, Flayhan A, Strauss J, Rantos V, Bartels K, Nielsen R, Pardon E, Steyaert J, Kosinski J, Quistgaard EM, and Low C. Structure of Prototypic Peptide Transporter DtpA from *E. coli* in Complex with Valganciclovir Provides Insights into Drug Binding of Human PepT1. *J Am Chem Soc.*, **141**, 2404-2412 (2019).
- 45) Omori A, Fujisawa Y, Sasaki S, Shimono K, Kikukawa T, and Miyauchi S. Protonation State of a Histidine Residue in Human Oligopeptide Transporter 1 (hPEPT1) Regulates hPEPT1-Mediated Efflux Activity. *Biol Pharm Bull.*, **44**, 678-685 (2021).
- 46) Morris GM, Huey R, Lindstrom W, Sanner MF, Belew RK, Goodsell DS, and Olson AJ. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *J Comput Chem.*, **30**, 2785-2791 (2009).
- 47) Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, and Ferrin TE. UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem.*, **25**, 1605-1612 (2004).

- 48) Kovalenko A, and Hirata F. Self-consistent description of a metal–water interface by the Kohn–Sham density functional theory and the three-dimensional reference interaction site model. *J Chem Phys.*, **110**, 10095-10112 (1999).
- 49) Terada T, Sawada K, Saito H, Hashimoto Y, and Inui K. Functional characteristics of basolateral peptide transporter in the human intestinal cell line Caco-2. *Am J Physiol.*, **276**, G1435-1441 (1999).
- 50) Irie M, Terada T, Katsura T, Matsuoka S, and Inui K. Computational modelling of H⁺-coupled peptide transport via human PEPT1. *J Physiol.*, **565**, 429-439 (2005).
- 51) Fujisawa Y, Kitagawa T, Miyake M, Nara T, Kamo N, and Miyauchi S. Measurement of electric current evoked by substrate transport via bi-directional H⁺/oligopeptide transporter over-expressed in HeLa cells: electrogenic efflux and existence of a newly observed channel-like state. *Arch Biochem Biophys.*, **445**, 166-173 (2006).
- 52) Smith DE, Cléménçon B, and Hediger MA. Proton-coupled oligopeptide transporter family SLC15: physiological, pharmacological and pathological implications. *Mol Aspects Med.*, **34**, 323-336 (2013).
- 53) Kim JH, Lingwood CA, Williams DB, Furuya W, Manolson MF, and Grinstein S. Dynamic measurement of the pH of the Golgi complex in living cells using retrograde transport of the verotoxin receptor. *J Cell Biol.*, **134**, 1387-1399 (1996).
- 54) Llopis J, McCaffery JM, Miyawaki A, Farquhar MG, and Tsien RY. Measurement of cytosolic, mitochondrial, and Golgi pH in single living cells with green fluorescent proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **95**, 6803-6808 (1998).
- 55) Ash EL, Sudmeier JL, De Fabo EC, and Bachovchin WW. A low-barrier hydrogen bond in the catalytic triad of serine proteases? Theory versus experiment. *Science.*, **278**, 1128-1132 (1997).
- 56) Blow DM. The tortuous story of Asp ... His ... Ser: structural analysis of alpha-chymotrypsin. *Trends Biochem Sci.*, **22**, 405-408 (1997).
- 57) Brandsch M, Brandsch C, Ganapathy ME, Chew CS, Ganapathy V, and Leibach FH. Influence of proton and essential histidyl residues on the transport kinetics of the H⁺/peptide cotransport systems in intestine (PEPT 1) and kidney (PEPT 2). *Biochim Biophys Acta.*, **1324**, 251-262 (1997).
- 58) Fei YJ, Liu W, Prasad PD, Kekuda R, Oblak TG, Ganapathy V, and Leibach FH. Identification of the histidyl residue obligatory for the catalytic activity of the human H⁺/peptide cotransporters PEPT1 and PEPT2. *Biochemistry.*, **36**, 452-460 (1997).
- 59) Chen XZ, Steel A, and Hediger MA. Functional roles of histidine and tyrosine residues in the H(+)-peptide transporter PepT1. *Biochem Biophys Res Commun.*, **272**, 726-730 (2000).
- 60) Terada T, Saito H, Mukai M, and Inui KI. Identification of the histidine residues involved in substrate recognition by a rat H⁺/peptide cotransporter, PEPT1. *FEBS Lett.*, **394**, 196-200 (1996).

- 61) Fei YJ, Liu JC, Fujita T, Liang R, Ganapathy V, and Leibach FH. Identification of a potential substrate binding domain in the mammalian peptide transporters PEPT1 and PEPT2 using PEPT1-PEPT2 and PEPT2-PEPT1 chimeras. *Biochem Biophys Res Commun.*, **246**, 39-44 (1998).
- 62) Tateoka R, Abe H, Miyauchi S, Shuto S, Matsuda A, Kobayashi M, Miyazaki K, and Kamo N. Significance of substrate hydrophobicity for recognition by an oligopeptide transporter (PEPT1). *Bioconjug Chem.*, **12**, 485-492 (2001).
- 63) Doki S, Kato HE, Solcan N, Iwaki M, Koyama M, Hattori M, Iwase N, Tsukazaki T, Sugita Y, Kandori H, Newstead S, Ishitani R, and Nureki O. Structural basis for dynamic mechanism of proton-coupled symport by the peptide transporter POT. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **110**, 11343-11348 (2013).
- 64) Guettou F, Quistgaard EM, Trésaugues L, Moberg P, Jegerschöld C, Zhu L, Jong AJ, Nordlund P, and Löw C. Structural insights into substrate recognition in proton-dependent oligopeptide transporters. *EMBO Rep.*, **14**, 804-810 (2013).
- 65) Zhao Y, Mao G, Liu M, Zhang L, Wang X, and Zhang XC. Crystal structure of the E. coli peptide transporter YbgH. *Structure.*, **22**, 1152-1160 (2014).
- 66) Turnbull WB, and Daranas AH. On the value of *c*: can low affinity systems be studied by isothermal titration calorimetry? *J Am Chem Soc.*, **125**, 14859-14866 (2003).
- 67) Sleigh SH, Tame JR, Dodson EJ, and Wilkinson AJ. Peptide binding in OppA, the crystal structures of the periplasmic oligopeptide binding protein in the unliganded form and in complex with lysyllysine. *Biochemistry.*, **36**, 9747-9758 (1997).
- 68) Sleigh SH, Seavers PR, Wilkinson AJ, Ladbury JE, and Tame JR. Crystallographic and calorimetric analysis of peptide binding to OppA protein. *J Mol Biol.*, **291**, 393-415 (1999).
- 69) Tame JR, Murshudov GN, Dodson EJ, Neil TK, Dodson GG, Higgins CF, and Wilkinson AJ. The structural basis of sequence-independent peptide binding by OppA protein. *Science.*, **264**, 1578-1581 (1994).
- 70) Ladbury JE, Klebe G, and Freire E. Adding calorimetric data to decision making in lead discovery: a hot tip. *Nat Rev Drug Discov.*, **9**, 23-27 (2010).
- 71) Rekharsky MV, and Inoue Y. Complexation Thermodynamics of Cyclodextrins. *Chem Rev.*, **98**, 1875-1918 (1998).
- 72) Martinez Molledo M, Quistgaard EM, Flayhan A, Pieprzyk J, and Low C. Multispecific Substrate Recognition in a Proton-Dependent Oligopeptide Transporter. *Structure.*, **26**, 467-476 e464 (2018).
- 73) Parker JL, Li C, Brinth A, Wang Z, Vogeley L, Solcan N, Ledderboge-Vucinic G, Swanson JMJ, Caffrey M, Voth GA, and Newstead S. Proton movement and coupling in the POT family of peptide transporters. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **114**, 13182-13187 (2017).

- 74) Schultz SG. *Basic principles of membrane transport*. Cambridge University Press, Cambridge, U.K. (1980).
- 75) Omori A, Fujisawa Y, Sasaki S, Kikukawa T, Shimono K, and Miyauchi S. Elucidation of a key mechanism of substrate-recognition by prokaryotic H⁺/oligopeptide co-transporter, YdgR with calorimetric analysis: The release of hydrated waters from the substrate binding pocket causes the versatile substrate recognitions. (in preparation)
- 76) Guettou F, Quistgaard EM, Raba M, Moberg P, Löw C, and Nordlund P. Selectivity mechanism of a bacterial homolog of the human drug-peptide transporters PepT1 and PepT2. *Nat Struct Mol Biol.*, **21**, 728-731 (2014).
- 77) Martinez Molledo M, Quistgaard EM, and Löw C. Tripeptide binding in a proton-dependent oligopeptide transporter. *FEBS Lett.*, **592**, 3239-3247 (2018).
- 78) Fowler PW, Orwick-Rydmark M, Radestock S, Solcan N, Dijkman PM, Lyons JA, Kwok J, Caffrey M, Watts A, Forrest LR, and Newstead S. Gating topology of the proton-coupled oligopeptide symporters. *Structure.*, **23**, 290-301 (2015).
- 79) Nagamura R, Fukuda M, Kawamoto A, Matoba K, Dohmae N, Ishitani R, Takagi J, and Nureki O. Structural basis for oligomerization of the prokaryotic peptide transporter PepT_{So2}. *Acta Crystallogr F Struct Biol Commun.*, **75**, 348-358 (2019).
- 80) Solcan N, Kwok J, Fowler PW, Cameron AD, Drew D, Iwata S, and Newstead S. Alternating access mechanism in the POT family of oligopeptide transporters. *EMBO J.*, **31**, 3411-3421 (2012).
- 81) Huang CY, Olieric V, Ma P, Panepucci E, Diederichs K, Wang M, and Caffrey M. In meso in situ serial X-ray crystallography of soluble and membrane proteins. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.*, **71**, 1238-1256 (2015).
- 82) Lyons JA, Parker JL, Solcan N, Brinth A, Li D, Shah ST, Caffrey M, and Newstead S. Structural basis for polyspecificity in the POT family of proton-coupled oligopeptide transporters. *EMBO Rep.*, **15**, 886-893 (2014).
- 83) Huang CY, Olieric V, Ma P, Howe N, Vogeley L, Liu X, Warshamanage R, Weinert T, Panepucci E, Kobilka B, Diederichs K, Wang M, and Caffrey M. In meso in situ serial X-ray crystallography of soluble and membrane proteins at cryogenic temperatures. *Acta Crystallogr D Struct Biol.*, **72**, 93-112 (2016).
- 84) Minhas GS, Bawdon D, Herman R, Rudden M, Stone AP, James AG, Thomas GH, and Newstead S. Structural basis of malodour precursor transport in the human axilla. *Elife.*, **7**, e34995 (2018).
- 85) Minhas GS, and Newstead S. Structural basis for prodrug recognition by the SLC15 family of proton-coupled peptide transporters. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **116**, 804-809 (2019).

- 86) Boggavarapu R, Jeckelmann JM, Harder D, Ucurum Z, and Fotiadis D. Role of electrostatic interactions for ligand recognition and specificity of peptide transporters. *BMC Biol.*, **13**, 58 (2015).

謝辞

本研究は2017年4月から2021年3月まで東邦大学大学院 薬学研究科 薬物動態学教室にて行ったものである。

本研究を遂行するにあたり、終始御指導、御鞭撻を賜りました薬物動態学教室 宮内 正二 教授、崇城大学 薬学部 物理化学研究室 下野 和実 教授に心より感謝し、厚く御礼申し上げます。

本研究に際し、終始有益な御指導と御助言を賜りました佐々木 将太郎 講師に深く感謝致します。

私の研究生生活において多くのご助言、ご協力を頂きました薬物動態学教室 清水 真紀 助教、研究室の皆様、増田 雅行 博士、杉尾 和昭 博士に深く感謝致します。

最後に、博士課程入学を快く承諾し、どのような状況においても応援してくれた家族に心から感謝致します。

令和3年3月 大森 明子